

**ÜBER DIE KOORDINATION
DER MITOCHONDRIALEN UND
CYTOPLASMATISCHEN PROTEINSYNTHESE
BEI DER BILDUNG VON MITOCHONDRIALEN
MEMBRANPROTEINEN, IM BESONDEREN
DER CYTOCHROMOXIDASE**

Axel A. von Rücker

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÜBER DIE KOORDINATION DER MITOCHONDRIALEN UND
CYTOPLASMATISCHEN PROTEINSYNTHESE
BEI DER BILDUNG VON MITOCHONDRIALEN MEMBRANPROTEINEN,
IM BESONDEREN DER CYTOCHROMOXIDASE

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von
Axel A. von Rücker
geboren in München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Feodor Lynen

Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher

Tag der Einreichung der Arbeit:

11. MAI 1976

Tag der mündlichen Prüfung :

13. JULI 1976



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h.c. Theodor Bücher und Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert durchgeführt.

Mein herzlichster Dank gilt allen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonders danken möchte Herrn Prof. Dr. Bücher für die großzügige Förderung dieser Arbeit, und Herrn Dr. Neupert für die stete Unterstützung und Ermunterung.

NO PAINS, NO GAINS

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. ERGEBNISSE	3
2.1. In vivo Untersuchungen der mitochondrialen Proteinsynthese in <i>Neurospora crassa</i> : Cycloheximid (CHI) als Werkzeug zur selektiven Erfassung der mitochondrialen Proteinsynthese in intakten Zellen	3
2.1.0. Problemstellung	3
2.1.1. Wirkung von CHI auf das Wachstum von <i>Neurospora</i> -Zellen	4
2.1.2. Veränderungen der intrazellulären Leucin-Konzentration (Leucinpool). Leucinbedarf der Zellen	6
2.1.3. Einbau von radioaktivem Leucin in ganze Zellen und in mitochondriale Membranen bei Zugabe von Leucin zum Kulturmedium in niedrigen und hohen Konzentrationen	8
2.1.3.1. Einbau von radioaktivem Leucin bei Zugabe von Leucin zum Kulturmedium in niedriger Konzentration	9
2.1.3.2. Einbau von radioaktivem Leucin bei Zugabe von Leucin zum Kulturmedium in hoher Konzentration	14
2.1.4. Aufnahme und Metabolisierung von Leucin in Zellen in Gegenwart von CHI	15
2.1.5. Translation an mitochondrialen Ribosomen. Bestimmung der Proteinsyntheseleistungen in Gegenwart von CHI mittels Puls-Chase Untersuchungen	23

	Seite
2.1.6. Translation an den cytoplasma- tischen Ribosomen in Gegenwart von CHI	29
2.1.7. Subzelluläre Lokalisation der in Gegenwart von CHI gebilde- ten Translationsprodukte	34
2.1.8. Produkte der Proteinsynthese in Gegenwart von CHI	36
2.1.8.1. Gelelektrophoretische Untersu- chung der in Gegenwart von CHI synthetisierten Proteine gan- zer Zellen und mitochondrialer Membranen	36
2.1.8.2. Immunopräzipitierbare Komponen- ten der Cytochromoxidase	47
2.2. Rolle intrazellulärer Protein- asen bei der Untersuchung der Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese	56
2.2.0. Problemstellung	56
2.2.1. Nachweis der Wirkung von proteo- lytischen Enzymen bei der Unter- suchung isolierter Mitochondrien	56
2.2.2. Lokalisation der Proteinase- Aktivität	62
2.2.3. Abhängigkeit der Proteinase- Aktivität in der Mitochondrien- Fraktion von der CHI-Inkubations- dauer der Zellen	67
2.2.4. Wirkung von Proteinase-Inhibito- ren bei der Untersuchung gan- zer Zellen	67
2.2.5. Möglichkeiten der Hemmung von proteolytischen Enzymen bei der Untersuchung isolierter Mito- chondrien	69

	Seite
2.3. Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien	73
2.3.0. Problemstellung	73
2.3.1. Untersuchung der Proteinsynthese isolierter Mitochondrien. Einsatz von Inkubationsmedien mit und ohne Komponenten des Cytoplasmas	73
2.3.1.1. Einbau von Leucin in Ab- und Anwesenheit von Zellsaft	73
2.3.1.2. Einbau von Leucin in isolierte Mitochondrien in Gegenwart eines aus Neurospora-Zellen isolierten Proteinase-Inhibitors	76
2.3.1.3. Einbau von Leucin in isolierte Mitochondrien nach Lyse der mitochondrialen Membran mit Triton X-100	78
2.3.2. Produkte der Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien	79
2.3.2.1. Gelelektrophoretische Untersuchung der synthetisierten Polypeptide	79
2.3.2.2. Immunopräzipitierbare Komponenten der Cytochromoxidase	86
2.3.2.3. Produkte der Proteinsynthese von detergens-solubilisierten Mitochondrien	92
2.3.3. Untersuchung der Proteinsynthese isolierter Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen	95
2.3.3.1. Einbau von radioaktivem Leucin in Abwesenheit von Zellsaft	95
2.3.3.2. Einbau von radioaktivem Leucin in Gegenwart von Zellsaft aus CHI-vergifteten Zellen	97
2.3.4. Produkte der Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen	98

	Seite
2.3.4.1. Polypeptide, die in Abwesenheit von Zellsaft synthetisiert werden	98
2.3.4.2. Polypeptide, die in Gegenwart von Zellsaft aus CHI-vergifteten Zellen hergestellt werden	102
2.3.5. Translation von Komponenten der Cytochromoxidase an den cytoplasmatischen Ribosomen <u>in vitro</u>	107
3. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	113
3.1. Translation an den mitochondrialen Ribosomen nach Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese	115
3.2. Integration von mitochondrialen Translationsprodukten in die mitochondriale Innenmembran nach Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese	117
3.3. Rolle von Proteinasen und Inhibitoren bei der Integration mitochondrialer Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran	120
3.4. Assemblierung der mitochondrial synthetisierten Untereinheiten der Cytochromoxidase	123
3.5. Ausblick	125

	Seite
4. MATERIAL UND METHODEN	127
4.1. Züchtung von <i>Neurospora crassa</i>	127
4.2. Isolierung von Mitochondrien	127
4.2.1. Isolierung nach Aufschluß der Zellen mit einer Mühle	127
4.2.2. Isolierung nach Aufschluß der Zellen mit Quarzsand	127
4.3. Isolierung mitochondrialer Membranen	128
4.4. Untersuchung ganzer Zellen	128
4.4.1. Extraktion der Proteine mit Detergentien	128
4.4.2. Aufschluß der Zellen mit Quarzsand	129
4.5. Dünnschichtchromatographie von Leucin und Leucinmetabolite im Kulturmedium	129
4.6. Isolierung von mitochondrialen Ribosomen	129
4.7. Isolierung von cytoplasmatischen Ribosomen	130
4.8. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation der Mitochondrienpräparationen	131
4.9. Herstellung der Inhibitor-Fraktion (IF)	131
4.10. Radioaktive Markierung der Zellen <u>in vivo</u>	132
4.10.1. Homogene Markierung aller Zellproteine	132
4.10.2. Spezifische Markierung in Gegenwart von CHI	132
4.11. Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien	133
4.11.1. Zusammensetzung des Inkubationsmediums	133

	Seite
4.11.2.	Herstellung eines Inkubations- mediums mit cytoplasmatischem Überstand (Zellsaft) 133
4.11.3.	Inkubationsbedingungen 133
4.12.	Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien in Gegenwart von cytoplasmatischen Ribosomen und Zellsaft 134
4.13.	Immunopräzipitation mit Anti- serum gegen Cytochromoxidase 134
4.13.1.	Herstellung des Antiserums 134
4.13.2.	Fällung mit Antiserum 135
4.14.	Polyacrylamid-SDS-Gelelektro- phorese 136
4.14.1.	Vorbereitung der Gele 136
4.14.2.	Vorbereitung der Proben 136
4.14.3.	Eichung der Gele 137
4.15.	Radioaktivitätsmessungen 137
4.15.1.	Meßgerät, Lösungen 137
4.15.2.	Vorbereitung der Proben 137
4.16.	Bestimmung der Aminosäurepools 138
4.17.	Proteinbestimmungen 139
4.18.	Succinatdehydrogenase (SDH)-Unter- suchungen 139
4.19.	Materialien 139
5.	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN 140
6.	ZUSAMMENFASSUNG 141
7.	LITERATURVERZEICHNIS 145

1. EINLEITUNG

Einige zentrale Proteinkomponenten der mitochondrialen Innenmembran (Cytochromoxidase, Cytochrom b, ATPase) sind aus Untereinheiten aufgebaut, die zum Teil an den cytoplasmatischen und zum Teil an den mitochondrialen Ribosomen gebildet werden (Übersichtsartikel: 1 - 5). Der Zusammenbau dieser Untereinheiten zu funktionsfähigen Proteinen erfordert die koordinierte Lieferung in Form von Polypeptidvorstufen. Diese Koordination wird noch wenig verstanden. Vermutlich sind daran verschiedene Mechanismen beteiligt (vgl. 4).

Alle bisher bekannten Proteine des mitochondrialen Transkriptions- und Translationsapparates (zum Beispiel die DNA- und die RNA-Polymerase, und die Strukturproteine der 70 S Ribosomen) werden durch die cytoplasmatische Proteinsynthese gebildet (6 - 11). Dies bedeutet, daß langfristig Produkte der cytoplasmatischen Proteinsynthese direkt die Translation und Transkription im Mitochondrium beeinflussen können. Weiterhin ist denkbar, daß die mitochondriale Proteinsynthese auch durch die Bereitstellung mitochondrialer Komponenten, wie zum Beispiel Lipiden und Häm, also indirekter Produkte der cytoplasmatischen Proteinsynthese, geregelt wird (12 - 14).

In den vergangenen Jahren sind Modelle entwickelt worden, um zu erklären, wie Produkte der mitochondrialen und der cytoplasmatischen Proteinsynthese Einfluß auf das jeweils andere Synthesesystem nehmen können (15 - 22). In einem Modell wird vorgeschlagen, daß die mitochondriale DNA für ein Repressorprotein kodiert, welches an den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert wird. Dieser Repressor soll bestimmte Gene im Zellkern reprimieren (22, 23).

Ein anderes Modell geht von der Beobachtung aus, daß nach Erschöpfung der Partner-Polypeptidpools cytoplasmatischen Ursprungs (zum Beispiel in Gegenwart von Hemmstoffen der cytoplasmatischen Proteinsynthese) scheinbar keine mitochondrial synthetisierten Polypeptide mehr nachweisbar sind. Es wird vorgeschlagen, daß die cytoplasmatischen Partner-Polypeptide die Transkription oder Translation im Mitochondrium steuern können (4).

Alle diese Modelle der Koordination der cytoplasmatischen und mitochondrialen Proteinsynthese führten jedoch bisher zu widersprüchlichen Aussagen.

Die vorliegende Arbeit versucht, zu dieser Problematik einen Beitrag zu liefern. Es wurde die Frage gestellt, wie die mitochondriale Proteinsynthese auf das Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese reagiert. Es sollte stufenweise verfolgt werden, wie sich die Syntheserate und die Art der mitochondrialen Translationsprodukte ändern.

Drei zeitlich aufeinanderfolgende Phasen sollten untersucht werden:

1. die Translation an mitochondrialen Ribosomen;
2. die Integration der fertiggestellten Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran;
3. die Assemblierung der mitochondrialen Translationsprodukte zu größeren Komplexen (Beispiel Cytochromoxidase).

Die selektive Ausschaltung der cytoplasmatischen Proteinsynthese wurde durch zwei verschiedene experimentelle Ansätze bewirkt:

- in vivo, durch Vergiften von ganzen Zellen mit Cycloheximid, einem spezifischen Hemmstoff der cytoplasmatischen 80 S Ribosomen, und
- in vitro mit isolierten Mitochondrien.

Sämtliche Experimente dieser Arbeit wurden an dem Wildtyp 74 A von *Neurospora crassa* durchgeführt.

2. ERGEBNISSE

- 2.1. In vivo Untersuchungen der mitochondrialen Proteinsynthese in *Neurospora crassa* : Cycloheximid (CHI) als Werkzeug zur selektiven Erfassung der mitochondrialen Proteinsynthese in intakten Zellen.

2.1.0. Problemstellung.

CHI wurde beschrieben als selektiver Hemmstoff der Initiation und Translokation an den cytoplasmatischen 80 S Ribosomen von eukaryotischen Zellen (23 - 26). Es hemmt nicht die mitochondrialen Ribosomen von eukaryotischen Zellen und stellt damit ein geeignetes Werkzeug dar, um Mechanismus und Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese zu untersuchen. Bisher liegt bereits eine große Anzahl von Untersuchungen vor, die die mitochondrialen Translationsprodukte, das Ausmaß der mitochondrialen Proteinsynthese, und die gegenseitige Abhängigkeit der cytoplasmatischen und mitochondrialen Proteinsynthese betreffen (4, 25 - 32). Dabei wurde jedoch in vielen Fällen nur ungenügend beachtet, daß dieser Hemmstoff sekundäre und unspezifische Effekte innerhalb der Zelle bewirkt. Die Kenntnis dieser Effekte ist jedoch bedeutend für die Interpretation von Experimenten, in denen CHI als Werkzeug eingesetzt wird. Deshalb wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluß dieses Inhibitors auf verschiedene zelluläre Parameter, wie Wachstum, intrazelluläre Aminosäurekonzentration, Vollständigkeit der Hemmung, u.a. untersucht. Dadurch konnte die Abhängigkeit der mitochondrialen Proteinsynthese von cytoplasmatischen Translationsprodukten erforscht werden.

2.1.1. Wirkung von CHI auf das Wachstum von Neurospora-Zellen.

Die Veränderung zellulärer Bezugsgrößen durch die Anwendung von CHI muß bekannt sein, wenn aus den Wirkungen von CHI Rückschlüsse auf zelluläre Vorgänge gezogen werden. Als solche Bezugsgrößen wurden herangezogen (Abb. 1) : a) das Trockengewicht der Zellen, b) das Gesamtprotein der Zellen, und c) die homogene radioaktive Markierung mitochondrialer Membranproteine.

a) Trockengewicht der Zellen:

Einer Zellkultur wurden nach Zugabe von CHI zu verschiedenen Zeiten aliquote Mengen entnommen. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Zellwasser wurde anschließend durch Lyophilisation entfernt. Das resultierende Trockengewicht ist in Abb. 1 aufgezeigt. Die Zunahme des Trockengewichts während der ersten zwei Stunden nach Zugabe von CHI entspricht der Zunahme des Trockengewichts einer Zellkultur ohne CHI (32). Nach weiteren zwei Stunden nimmt die Zuwachsrate des Trockengewichts bis auf etwa 60 - 70 % der ursprünglichen Rate ab.

b) Gesamtprotein der Zellen:

In aliquoten Proben (vgl. oben) wurde die jeweilige Menge an Gesamtprotein bestimmt. Über einen Zeitraum von 4 Stunden konnte keine Veränderung festgestellt werden (Abb. 1). Eine meßbare Neubildung oder ein meßbarer Abbau von Protein findet demnach in Gegenwart von CHI nicht statt.

c) homogene radioaktive Markierung mitochondrialer Membranproteine:

Zellen wurden in Abwesenheit von CHI mit $^{14}\text{-C}$ Leucin homogen

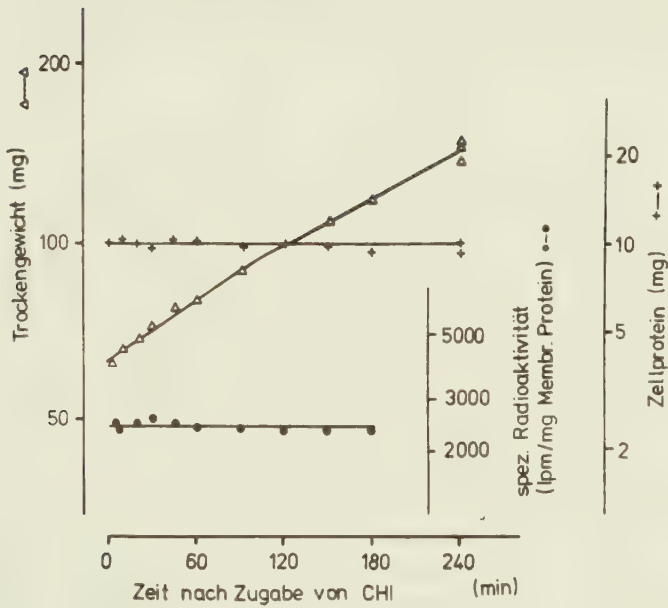


Abb. 1

Wirkung von CHI auf das Gewicht, den Proteingehalt und die homogene Markierung in mitochondriale Membranen von wachsenden Zellen.

- Δ - Δ : Trockengewichte von 50-ml-Portionen,
 x - x: Zellproteingehalt von 100-ml-Portionen, und
 ● - ●: spezifische Radioaktivität (Ipm pro mg mitochondriales Membranprotein)

2 Stunden markiert. Nach Zugabe von CHI wurden zu verschiedenen Zeiten mitochondriale Membranen isoliert (vgl. Methoden). Es wurde keine Veränderung der spezifischen Radioaktivität über einen Zeitraum von 3 Stunden festgestellt.

2.1.2. Veränderungen der intrazellulären Leucin-Konzentration (Leucinpool). Leucinbedarf der Zellen.

Da CHI den überwiegenden Teil der Proteinsynthese hemmt, bedeutet dies gleichzeitig, daß Aminosäuren, die von der Zelle gebildet werden, zu einem erheblichen Teil nicht verbraucht werden können. Dementsprechend ist zu erwarten, daß sich die Konzentration der einzelnen Aminosäuren in der Zelle verändert. Dies wiederum ist von Bedeutung für die Untersuchung der mitochondrialen Proteinsynthese, da dadurch die intrazellulären spezifischen Radioaktivitäten von zugesetzten radioaktiven Aminosäuren in erheblichem Maße beeinflusst werden können. Diese spezifischen Radioaktivitäten stellen die Grundlage für die Berechnung der Syntheserate dar.

Nach Zugabe von CHI wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten schnell isoliert und mittels flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um metabolische Veränderungen auszuschalten. Die Zellen wurden dann bei -30°C aufgeschossen, und der spezifische Gehalt an intrazellulären Aminosäuren bestimmt (vgl. Methoden).

Abb. 2 zeigt, daß dieser Gehalt für alle untersuchten Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin) während der Inkubation der Zellen mit CHI stark ansteigt. Er erreicht

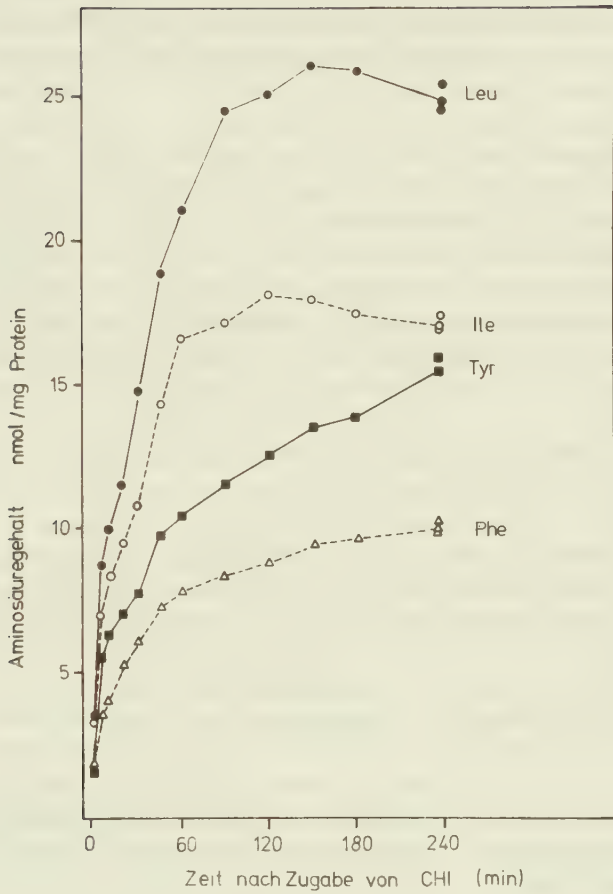


Abb. 2

Zeitverlauf des intrazellulären Gehalts von vier Aminosäuren (Aminosäure-Pool) nach Zugabe von CHI.

Der Meßwert zum Zeitpunkt Null entspricht dem Mittelwert von drei Messungen.

für Leucin nach 90 min einen Wert, der etwa 8fach höher ist als derjenige von Zellen, die nicht mit CHI behandelt wurden. In Kontrollzellen verändern sich innerhalb des untersuchten Zeitraums die spezifischen Aminosäuregehalte nicht.

Der Leucinbedarf einer Zellkultur errechnet sich aus der Verdopplungszeit von 200 min und dem durchschnittlichen Leucingehalt des Gesamtproteins von 7 % zu etwa 1,9 nMol/mg Zellprotein/min. Für die mitochondriale Proteinsynthese beträgt der Bedarf an Leucin nur 0,056 nMol/mg Zellprotein/min, oder etwa 3 % des Gesamtbedarfs der Zellen (32). Das bedeutet, daß der Verbrauch an Leucin durch die weiterlaufende mitochondriale Proteinsynthese in Gegenwart von CHI nur geringfügige Veränderungen des gemessenen Leucinpools verursacht und daher vernachlässigt werden kann.

Aus der anfänglichen Anstiegsgeschwindigkeit der Leucinkonzentration in Gegenwart von CHI in Abb. 2 läßt sich eine scheinbare Neubildung von Leucin von etwa 1,0 nMol Leucin/mg Zellprotein/min ermitteln. Dieser Wert ist somit etwa halb so hoch wie derjenige von Zellen, die nicht mit CHI behandelt wurden. Weiterhin läuft die Neubildung von Leucin mindestens 90 min weiter. Diese Befunde schließen jedoch nicht aus, daß die tatsächliche Leucin-Neubildung in Gegenwart von CHI höher ist, da eine gleichzeitige Metabolisierung des Leucins stattfinden kann (siehe Kapitel 2.1.3.).

2.1.3. Einbau von radioaktivem Leucin in ganze Zellen und in mitochondriale Membranen bei Zugabe von Leucin zum Kulturmedium in niedrigen und hohen Konzentrationen.

Setzt man einer Kultur von Neurospora-Zellen radioaktives Leucin zu, so wird die Geschwindigkeit, mit der die Zellproteine radioaktiv markiert werden, von der spezifischen Radioaktivität des zugegebenen Leucins abhängen. Um eine möglichst hohe Markierung zu bekommen, wird gewöhnlich Leucin von hoher spezifischer Aktivität verwendet. Durch die CHI-bedingte Erhöhung der intrazellulären Leucinkonzentration verändert sich jedoch laufend die spezifische Radioaktivität. Das bedeutet, daß das Ausmaß des Einbaus von radioaktivem Leucin nicht zur Ermittlung der Proteinsyntheserate verwendet werden kann. Dieser Umstand ist in der Literatur in einer Reihe von Untersuchungen nicht beachtet worden (25, 31, 33).

Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurde ein Serie von Experimenten angestellt, in denen die Konzentration des von außen angebotenen Leucins so hoch gewählt wurde, daß die spezifische Radioaktivität des Leucins durch die CHI-bedingte Erhöhung des Leucinpools nicht, oder nur geringfügig verändert wurde.

2.1.3.1. Einbau von radioaktivem Leucin bei Zugabe von Leucin zum Kulturmedium in niedriger Konzentration.

In Abb. 3A und 3B ist der Einbau von 3-H Leucin in Gegenwart von CHI in das Protein ganzer Zellen und mitochondrialer Membranen bei niedriger Leucinkonzentration im Kulturmedium gezeigt.

Dieser Einbau wurde 2,5 min und 62,5 min nach der Vergiftung der Zellen mit CHI gemessen, das heißt zu Zeitpunkten, an denen sich die intrazellulären Leucinpools

um den Faktor von ca. 4 unterscheiden. Das Anwachsen des Leucinpools ist nach 62,5 min nahezu beendet (Abb. 2). Die dem Kulturmedium zugegebene Menge von Leucin wurde zu dem gemessenen intrazellulären Leucingehalt ins Verhältnis gesetzt:

Tabelle 1a:

Zeit nach Zugabe von CHI	vorhandene Menge an Leucin in Zel- len	zugegebene Menge an Leucin	Verhältnis
2,5 min	5 nMol/mg Protein	0,3 nMol/mg Protein	17 : 1
62,5 min	21 nMol/mg Protein	0,3 nMol/mg Protein	70 : 1

Aus dem Verhältnis der intrazellulär-verhandenen Mengen von Leucin zu den zugegebenen Mengen von Leucin läßt sich ersehen, daß zu den angegebenen Zeitpunkten sich die resultierenden spezifischen Radioaktivitäten ebenfalls um einen Faktor von etwa 4 unterscheiden müssen. Das bedeutet, daß die initialen Einbauraten von radioaktivem Leucin sich bei gleichbleibender Proteinsyntheserate auch um den Faktor 4 unterscheiden müssen.

Der Einbau von 3-H Leucin wurde auf den Einbau von 14-C Leucin bezogen, der dadurch erzielt wurde, daß 14-C Leucin 120 Minuten vor Zugabe von CHI zum Kulturmedium gegeben wurde (vgl. Abschnitt 2.1.1).

Abb. 3A zeigt den Einbau in Gesamtzellprotein und in mitochondriales Membranprotein von Zellen, die 2,5 min mit CHI vor Zugabe von 3-H Leucin inkubiert wurden. Der Einbau erfolgt in beiden Fällen für etwa 10 min mit konstanter Geschwindigkeit, und ist nach 20 bis 30 Minuten nahezu been-

det. Die Skalen für Gesamtzellprotein und mitochondriales Membranprotein unterscheiden sich um den Faktor 5. Da sich bei diesem Skalenverhältnis die Einbaukurven überdecken, darf geschlossen werden, daß die mitochondrialen Membranen ca. 20 % des Leucins aller Zellproteine enthalten.

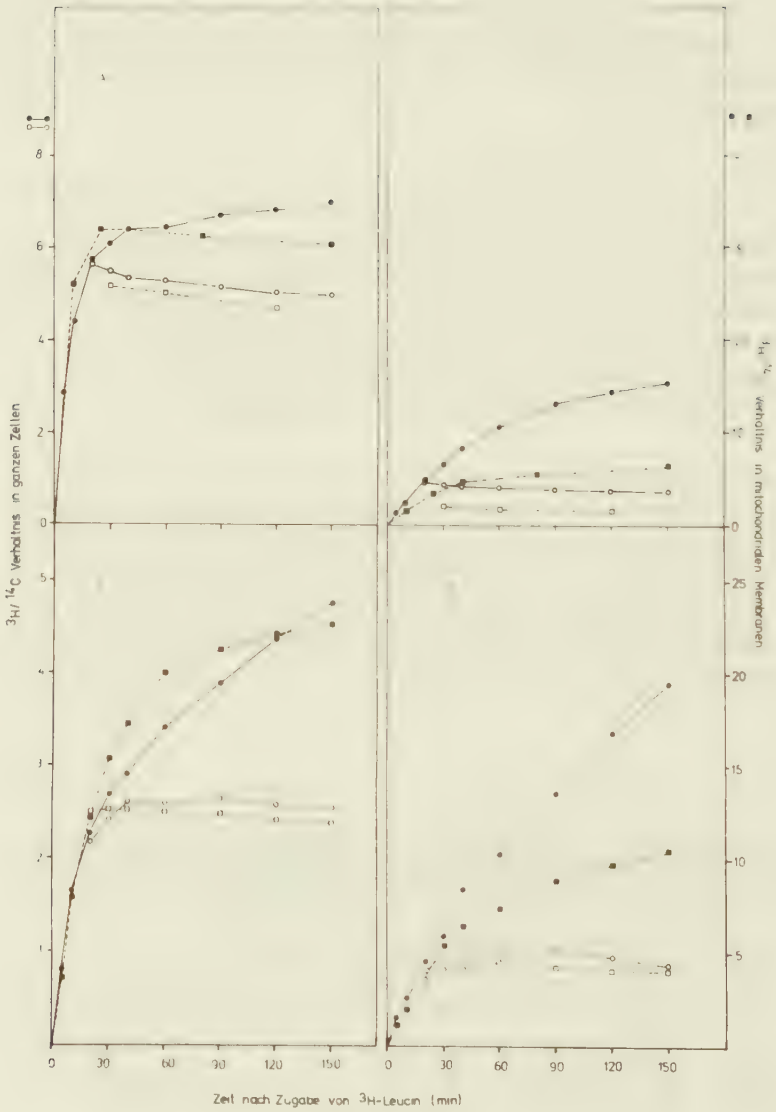
Abb. 3B zeigt das gleiche Experiment mit Zellen, die 62,5 min mit CHI vorinkubiert wurden. Obwohl man nach den Ergebnissen von Abb. 3A erwarten sollte, daß 3-H Leucin nach 62,5 min in Gegenwart von CHI nicht mehr eingebaut wird, beobachtet man einen deutlichen Einbau in Gesamtzellprotein und mitochondriales Membranprotein. Eine Erklärung für dieses Phänomen ergibt sich aus folgenden Beobachtungen und Überlegungen:

Berücksichtigt man die Veränderungen des intrazellulären Leucinpools (Abb. 2), so errechnet sich aus der initialen Synthesegeschwindigkeit nach 62,5 min CHI-Vorinkubation im Vergleich zu 2,5 min CHI-Vorinkubation eine Proteinsyntheserate von etwa 40 %, bezogen auf Gesamtzellprotein, und etwa 20 %, bezogen auf mitochondriales Membranprotein.

Abb. 3 (Seite 12)

Zeitverlauf des Einbaus von 3-H Leucin in Gegenwart von CHI in das homogen mit ^{14}C leucinmarkierte Protein ganzer Zellen (—) und mitochondrialer Membranen (----).

- A , B : Zugabe von Leucin in niedriger Konzentration (0,3 nMol/mg Zellprotein);
- C , D : Zugabe von Leucin in hoher Konzentration (500 nMol/mg Zellprotein);
- A , C : Zugabe von 3-H Leucin nach 2,5 min CHI-Vorinkubation;
- B , D : Zugabe von 3-H Leucin nach 62,5 min CHI-Vorinkubation;
- , □ : der Einbau von 3-H Leucin wurde nach 15 min durch Zugabe eines Leucinchases unterbrochen.



Weiterhin hört im Unterschied zu Abb. 3A der Einbau von 3-H Leucin nicht auf, sondern läuft nach 30 min mit etwa der halben Anfangsgeschwindigkeit weiter. Die einfachste Erklärung für dieses Phänomen ist somit, daß neben dem Anwachsen des Leucinpools in den Zellen eine Metabolisierung des Leucins stattfindet. Diese Metabolisierung würde bewirken, daß bei niedrigen intrazellulären Leucinkonzentrationen das zugegebene radioaktive Leucin schnell aus dem Leucinpool entfernt würde, bei höheren intrazellulären Leucinkonzentrationen jedoch nur langsam. Die Folge wäre im ersten Fall ein schnelles Absinken der spezifischen Radioaktivität des Leucins, im zweiten Fall ein langsames Absinken. Der direkte Nachweis der Metabolisierung von Leucin wird im nächsten Abschnitt (2.1.4.) geführt.

In Abb. 3B ist eine weitere Beobachtung auffallend: Die Einbaukurven von ganzen Zellen und mitochondriale Membranen überdecken sich nicht wie in Abb. 3A, das heißt, die Hälfte der unter diesen Umständen gebildeten Proteine befinden sich nicht in der mitochondrialen Membran. Dies bedeutet: Entweder werden mitochondrial-synthetisierte Polypeptide nicht mehr in die mitochondriale Membran integriert oder unter diesen Umständen wird sichtbar, daß die Hemmung der Translation an cytoplasmatischen Ribosomen durch CHI nicht vollständig ist. Mit diesem Problem beschäftigen sich u.a. die folgenden Kapitel.

In Abb. 3A und B wurde jeweils nach 15 min ein Chase gegeben, das heißt unmarkiertes Leucin wurde in hohen Mengen (ca. 25000 nMol/mg Zellprotein) zu dem Kulturmedium gegeben, um den Einbau von radioaktivem Leucin auszuschalten. Dies wurde getan, um die Stabilität des

in Gegenwart von CHI mit radioaktivem Leucin markierten Proteins zu prüfen. Die Daten in Abb. 3A und 3B zeigen, daß tatsächlich kein erheblicher Abbau stattfindet. In Abb. 3A läßt sich innerhalb von 120 min Chase eine Abnahme von ca. 10 % messen.

2.1.3.2. Einbau von radioaktivem Leucin bei Zugabe von Leucin zum Kulturmedium in hoher Konzentration.

Tabelle 1b:

Zeit nach Zugabe von CHI	vorhandene Menge an Leucin in Zellen	zugegebene Menge an Leucin	Verhältnis
2,5 min	5 nMol/mg Protein	500 nMol/mg Protein	1 : 100
62,5 min	21 nMol/mg Protein	500 nMol/mg Protein	4 : 100

Tabelle 1b zeigt die Verhältnisse von vorhandenen zu zugegebenen Leucinmengen nach 2,5 und 62,5 min CHI-Vorinkubation der Zellen im Falle von hoher Leucinkonzentration im Kulturmedium. Hier unterscheiden sich offensichtlich die spezifischen Aktivitäten des intrazellulären Leucins nur unwesentlich. Ferner kann man erwarten, daß durch endogene Neubildung und Metabolisierung von Leucin die spezifische Radioaktivität nur langsam verändert wird.

Tatsächlich zeigt Abb. 3C (2,5 min CHI-Vorinkubation), daß der Einbau von 3-H Leucin nicht, wie in Abb. 3A, nach 20 bis 30 min aufhört, sondern selbst nach 150 min, wenn auch

mit wesentlich verringerter Geschwindigkeit, weiterläuft. Trotzdem wird in Abb. 3C ein Langsamwerden der Proteinsynthese nur vorgetäuscht, denn, wie die Abb. 3D zeigt, ist nach 62,5 min CHI-Vorinkubation die initiale Einbaurrate um ein Vielfaches höher als nach 60 min kontinuierlicher Markierung in Abb. 3C. Dies impliziert, daß auch bei höheren Leucinkonzentrationen eine Veränderung der intrazellulären spezifischen Radioaktivität von Leucin stattfinden muß.

Auch in diesem Fall zeigt der Chase, daß die gebildeten Produkte weitgehend stabil sind. Insgesamt läßt sich schließen, daß eine relativ lockere Kopplung zwischen der cytoplasmatischen und der mitochondrialen Proteinsynthese besteht, da nach einer halben Verdopplungszeit der Zellen die Integration stabiler Produkte in die mitochondriale Membran höchstens auf 30 % abgesunken ist. Dieses Ergebnis sagt nichts aus über die Translationsleistung der mitochondrialen Ribosomen, da durch die Experimente die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß ein Teil der Translationsprodukte vor ihrer Integration in die mitochondriale Membran abgebaut werden könnten. Diese Möglichkeit wird in Kapitel 2.1.7 untersucht.

2.1.4 Aufnahme und Metabolisierung von Leucin in Zellen in Gegenwart von CHI.

Neben der Veränderung des intrazellulären Leucinpools durch Anhäufung der Aminosäure bei blockierter cytoplasmatischer Proteinsynthese müssen folgende Faktoren in Betracht gezogen werden, die die spezifische Radioaktivität des Leucins in den Zellen beeinflussen können und damit die Berechnung der Proteinsyntheserate erschweren:

- a. die spezifische Radioaktivität des intrazellulären Leucins hängt von der Geschwindigkeit ab, mit der radioaktives Leucin in die Zellen aufgenommen wird.
- b. durch Metabolisierung von Leucin kann sich die spezifische Radioaktivität des intrazellulären Leucins verändern.

Diese beiden Faktoren sollen im folgenden untersucht werden.

a. Aufnahme von Leucin:

Als Kontrolle wurde zunächst die Aufnahme von 3-H Leucin in Zellen gemessen, die nicht im CHI vergiftet waren.

Bei Angebot von Leucin in niedriger Konzentration (0,3 nMol/mg Zellprotein) finden sich nach 5 min nur noch weniger als 0,5 % der eingesetzten Radioaktivität im Kulturmedium. Bei Zugabe von Leucin in höherer Konzentration (500 nMol/mg Zellprotein) werden im gleichen Zeitraum nur 75 % der eingesetzten Radioaktivität von den Zellen aufgenommen. Es dauert weitere 60 min, bis weniger als 1 % der eingesetzten Radioaktivität im Kulturmedium nachweisbar ist (32).

Abb. 4 zeigt den Verlauf der Aufnahme von radioaktivem Leucin in Zellen, die mit CHI vergiftet wurden. Die Aufnahme wurde gemessen, nachdem 2,5 min und 62,5 min mit CHI vorinkubiert worden war.

Bei niedrigen Konzentrationen erfolgt die Aufnahme von radioaktivem Leucin nicht mehr so schnell wie in Abwesenheit von CHI. Im Fall der Zellen, die 2,5 min mit CHI vorbehandelt wurden, sind nach 5 min noch etwa 10 % der eingesetzten Radioaktivität im Kulturmedium. Werden die Zellen 62,5 min mit CHI vorinkubiert, sinkt die Aufnahmegeschwindigkeit von 3-H Leucin weiter ab. Hier sind nach 5 min noch 45 % der

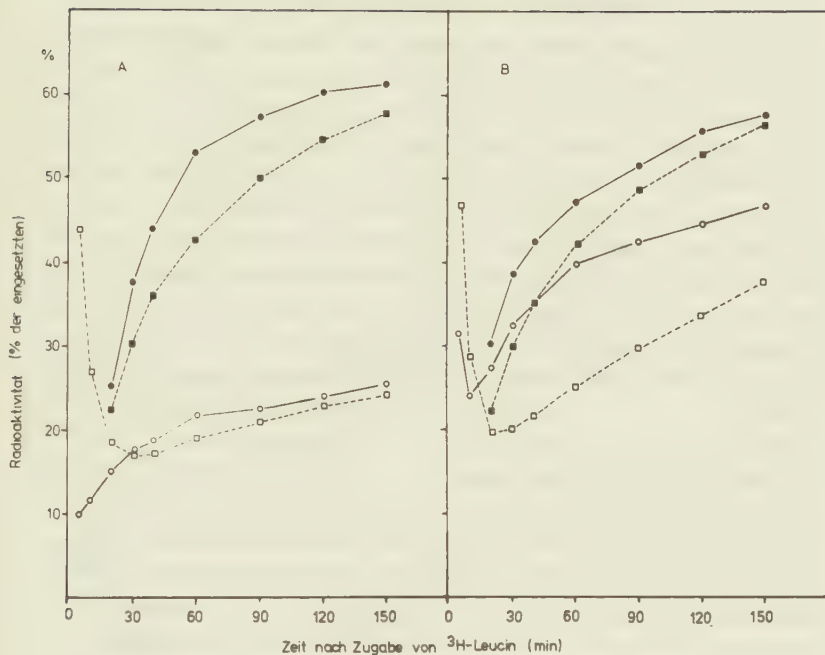


Abb. 4

Zeitverlauf der Aufnahme von radioaktivem Leucin in Zellen in Gegenwart von CHI.

Angegeben ist die im Kulturmedium verbleibende Radioaktivität.

A : bei niedriger Leucinkonzentration;

B : bei hoher Leucinkonzentration;

durchgezogene Linie: Zugabe von ^3H Leucin nach 2,5 min
CHI-Vorinkubation;

unterbrochene Linie: Zugabe von ^3H Leucin nach 62,5 min
CHI-Vorinkubation;

● , ■ : die Aufnahme von radioaktivem Leucin wurde nach 15 min durch Zugabe eines Leucinchases abgebrochen.

eingesetzten Radioaktivität im Kulturmedium (Abb. 4A).

Die Aufnahme von radioaktivem Leucin in höherer Konzentration ist sowohl nach 2,5 min als auch nach 62,5 min CHI-Vorinkubation im Vergleich zu Zellen, die nicht mit CHI behandelt wurden, geringfügig verlangsamt.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Leucinaufnahme der Zellen von der Leucinkonzentration im Kulturmedium und vor allem von der Dauer der CHI-Vorinkubation abhängig ist. Dies wiederum impliziert, daß die Kinetik des Einbaus von radioaktivem Leucin in Proteine in Gegenwart von CHI von diesen Faktoren mitbestimmt wird.

b. Metabolisierung von Leucin:

Wie Abb. 4 zeigt, folgt in CHI vergifteten Zellen nach einer Phase, in der radioaktives Leucin aus dem Medium aufgenommen wird, eine Phase, in der ein Teil der aufgenommenen Radioaktivität wieder an das Kulturmedium abgegeben wird. Nach Zugabe von Leucin in niedriger Konzentration (0,3 nMol/mg Zellprotein) befinden sich nach 150 min Inkubation etwa 22 - 25 % der eingesetzten Radioaktivität im Kulturmedium. Hierbei spielt die CHI-Vorinkubationsdauer keine Rolle. Bei Zugabe höherer Leucinkonzentrationen (500 nMol/mg Zellprotein) kehrt noch mehr Radioaktivität in das Kulturmedium zurück. Je nach CHI-Vorinkubation finden sich zwischen 33 - 45 % der eingesetzten Radioaktivität nach 150 min Inkubation im extrazellulären Raum.

In Parallelansätzen wurde den Zellen 15 min nach Zusatz von radioaktivem Leucin in Gegenwart von CHI ein "Chase" von unmarkiertem Leucin (25000 nMol/mg Zellprotein) gegeben, um den weiteren Verbrauch bzw. die weitere Metabolisierung von radioaktivem Leucin auszuschalten. Nach 150 min

Inkubation können in allen Fällen 55 bis 60 % der zugegebenen Radioaktivität im Kulturmedium nachgewiesen werden (Abb. 4).

Diese Ergebnisse bedeuten zunächst, daß die Verteilung der Radioaktivität zwischen Kulturmedium und Intrazellulärraum in Gegenwart von CHI von der zugesetzten Leucinkonzentration und von der Inkubationsdauer der Zellen nach Zugabe von radioaktivem Leucin abhängig ist.

Tabelle 2 zeigt die Verteilung der im Kulturmedium befindlichen Radioaktivität auf Leucin und Leucin-Metabolite jeweils 150 min nach Zugabe von 3-H Leucin in (a) niedriger und (b) höherer Konzentration in Gegenwart von CHI. In allen Fällen können radioaktive Leucin-Metabolite, hauptsächlich α -Ketoisocaproinsäure, beobachtet werden. Bei niedriger Leucinkonzentration wird die zugesetzte Radioaktivität schneller metabolisiert als bei höherer. Abb. 5 zeigt die Auftrennung der im Kulturmedium vorhandenen Radioaktivität in Leucin und Leucin-Metabolite mittels Dünnschichtchromatographie.

Abb. 5 (Seite 20)

Dünnschichtchromatographische Verteilung der Radioaktivität im Kulturmedium nach 150 min Inkubation der Zellen in Gegenwart von CHI (vgl. Abb. 4A).

- A , B : Zugabe von 3-H Leucin nach 2,5 min CHI-Vorinkubation;
C , D : Zugabe von 3-H Leucin nach 62,5 min CHI-Vorinkubation;
B , D : die Aufnahme von 3-H Leucin wurde nach 15 min durch Zugabe eines Leucin-chases abgebrochen;
I : anfärbbar mit Ninhydrin (Leucin-Fleck); durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie wurde nachgewiesen, daß die Radioaktivität in dieser Fraktion Leucin repräsentiert;
II : anfärbbar mit Dinitrophenylhydrazin (α -Ketoisocaproinsäure);
(---) : 14-C Leucin nach Co-Chromatographie.

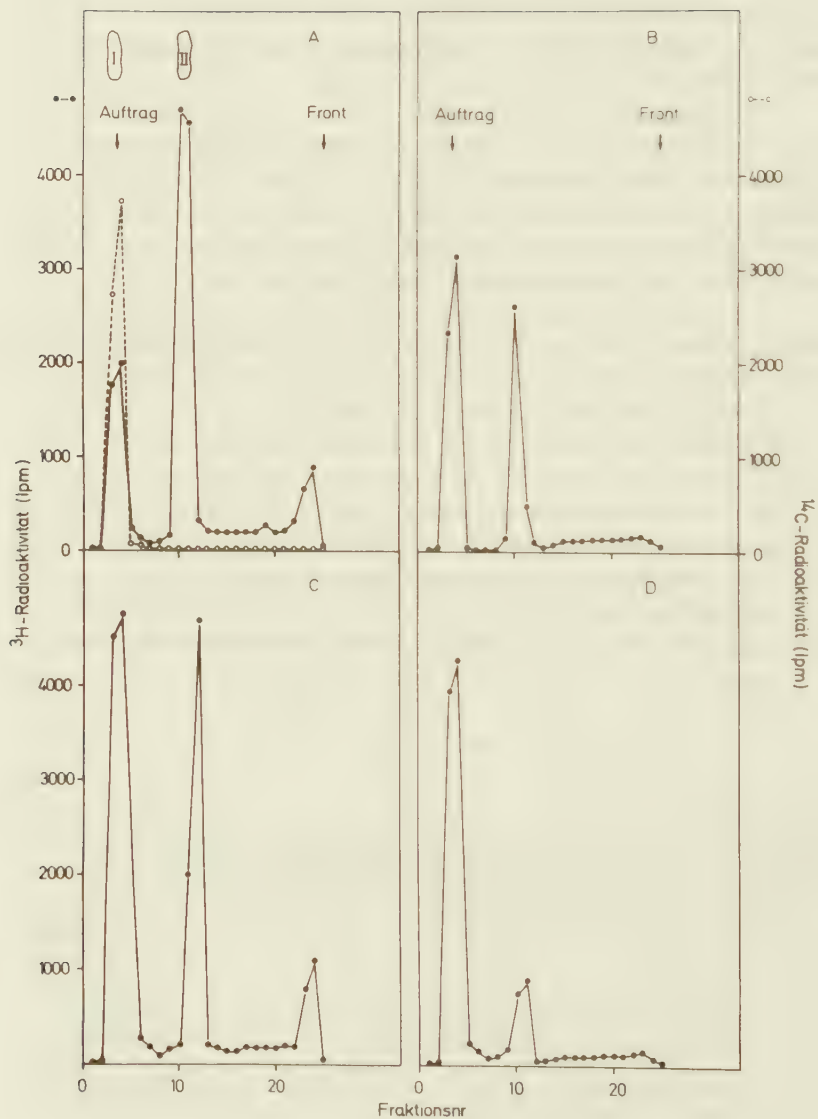


Tabelle 2:

Verteilung der Radioaktivität auf Leucin und Leucin-Metabolite im Kulturmedium 150 min nach Zugabe von 3-H Leucin in niedriger und höherer Konzentration.

CHI-Vorin- kubation (min)	Leucinchase (25000 nMol/ mg Zellprotein)	Radioaktivität in		
	15 min nach Zu- gabe von 3-H Leucin	Leucin	α -Ketoisocapron- säure	sonstige Metabolite
		(% der gesamten Radioaktivität im Kulturmedium)		

a. bei niedriger Leucinkonzentration (0,3 nMol/mg Zellprotein)

2,5	-	18	60	22
2,5	+	57	34	9
62,5	-	48	35	17
62,5	+	77	18	5

b. bei höherer Leucinkonzentration (500 nMol/mg Zellprotein)

2,5	-	12	71	17
2,5	+	84	14	2
62,5	-	21	68	11
62,5	+	88	10	2

Ein Vergleich der radioaktiv markierten Komponenten im Kulturmedium mit denjenigen im perchlorsäurelöslichen Anteil der Zellen ergibt, daß radioaktive Leucin-Metabolite im extrazellulären Raum in Gegenwart von CHI angereichert werden. Diese Anreicherung ist abhängig von der Höhe der Konzentration des radioaktiven Leucins, das dem Kulturmedium zugesetzt wurde. So beträgt 150 min nach Zugabe von 3-H Leucin in niedriger Konzentration in Gegenwart von CHI der Anteil radioaktiver Leucin-Meta-

bolite im extrazellulären Raum 82 % (2,5 min CHI-Vorinkubation) bzw. 52 % (62,5 min CHI-Vorinkubation) (vgl. Tabelle 2). Im intrazellulären Raum beträgt dieser Anteil nur 61 % bzw. 42 %. Bei Zugabe höherer Leucinkonzentrationen liegt der Anteil radioaktiver Leucin-Metabolite im intrazellulären Raum sogar nur bei 13 % bzw. 8 %. Hingegen beträgt dieser Anteil im extrazellulären Raum (Tab. 2) 88 % (2,5 min CHI-Vorinkubation) bzw. 78 % (62,5 min CHI-Vorinkubation). Wird ein Chase von unmarkiertem Leucin (25000 nMol/mg Zellprotein) gegeben, sind über 98 % der intrazellulären perchlorsäurelöslichen Radioaktivität in allen Fällen Leucin.

Unter Zuhilfenahme dieser Daten kann die Leucinmetabolisierungsgeschwindigkeit berechnet werden. Sie beträgt während der ersten 15 min nach Zugabe von β -H Leucin in niedriger Konzentration etwa 2 - 3 nMol Leucin pro mg Zellprotein und min. Bei Zugabe höherer Leucinkonzentrationen steigt dieser Wert auf das Zehnfache an. Das bedeutet jedoch nicht, daß diese Werte nicht noch wesentlich höher sein können. Es ist nämlich nicht ausgeschlossen, daß sich in Gegenwart von CHI Leucin-Metabolite wieder in Leucin zurückverwandeln können.

Die Kinetik des Einbaus von radioaktivem Leucin in Proteine in Gegenwart von CHI ist somit von der Leucinaufnahme der Zellen und von der in den Zellen stattfindenden Leucin-Metabolisierung abhängig. Es zeigt sich jedoch auch, daß auf Grund der Überlagerung der einzelnen zellulären Prozesse keine exakten Aussagen über den Grad der Abhängigkeit zu machen sind. Es muß betont werden, daß auch weitere Komplikationen nicht ausgeschlossen sind. Insbesondere können innerhalb der Zelle verschiedene Leucinpools existieren, etwa ein mitochondrialer und ein cytoplasmatischer Pool. Da die Umwandlung von α -Ketoisocaprönsäure zu Leucin wahrschein-

lich spezifisch im Mitochondrium stattfindet, ist eine solche Möglichkeit nicht ausgeschlossen (36, 37).

Die Ergebnisse dieses Kapitels legen nahe, bei der Untersuchung der mitochondrialen Proteinsynthese-Leistungen in Gegenwart von CHI Techniken anzuwenden, die die Konstanthaltung leicht variabler Parameter ermöglichen, wie es die Aufnahme und Metabolisierung von Aminosäuren zu sein scheinen. Am geeignetsten erwiesen sich dazu Puls-Chase Techniken, wie sie im nächsten Kapitel beschrieben werden.

2.1.5. Translation an mitochondrialen Ribosomen.

Bestimmung der Proteinsyntheseleistungen in Gegenwart von CHI mittels Puls-Chase Untersuchungen.

Die Translationsgeschwindigkeiten der mitochondrialen Ribosomen von Neurospora-Zellen in Gegenwart von CHI wurden durch Puls-Chase Experimente ermittelt. Eine Zellkultur wurde 2,5 min mit CHI vorbehandelt. Dann wurde radioaktives Leucin mit hoher spezifischer Radioaktivität zugegeben, um eine starke Markierung der naszierenden Polypeptidketten zu bewirken. Nach 5 min Inkubation wurde zu den Zellen ein Leucin-chase gegeben (25000 nMol/mg Zellprotein).

Abb. 6 zeigt die unter diesen Bedingungen erfolgende Abnahme der mit mitochondrialen Ribosomen assoziierten Radiaktivität. Diese Radioaktivität repräsentiert die naszierende Polypeptidketten. Sie wird von den Ribosomen gemäß einer Exponentialfunktion mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 125 sec abgelöst. Die Kettenverlängerungsgeschwindigkeit läßt sich daraus und unter der Annahme eines durchschnittlichen Molekulargewichts der Polypeptidketten von 30000 errechnen. Sie beträgt etwa 1,1 Aminosäuren pro sec.

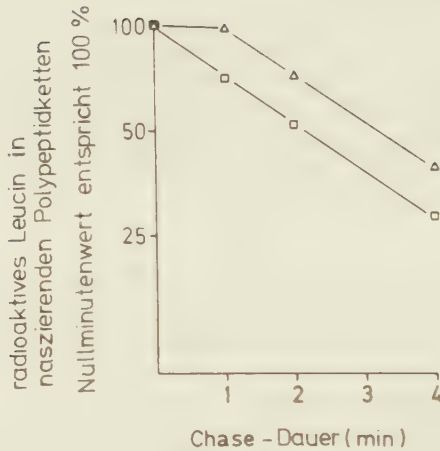


Abb. 6

3-H Leucin in naszierenden Polypeptidketten an mitochondriale Ribosomen: Abhängigkeit von der Dauer des Leucinchase. Zellen wurden nach 2,5 min (□) und 122,5 min (Δ) CHI-Vorinkubation der Zellen mit 3-H Leucin 5 min inkubiert. Der weitere Einbau von 3-H Leucin in naszierende Polypeptidketten wurde nach Zugabe eines Leucinchase gestoppt.

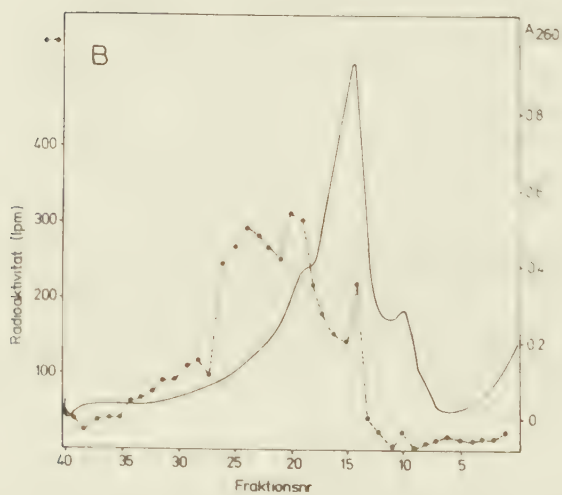
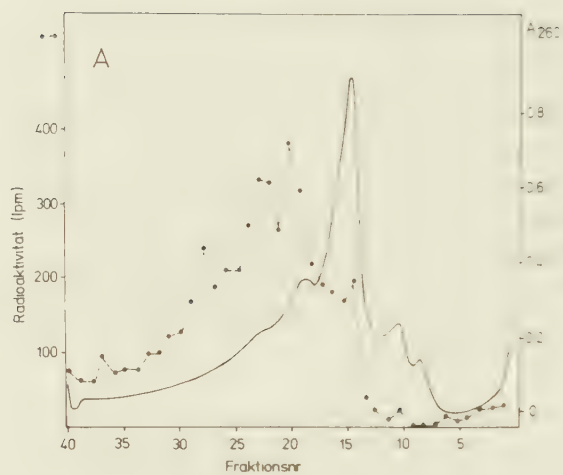
In einem Parallelversuch wurden Zellen 122,5 min mit CHI vorinkubiert. Darauf wurde die gleiche Puls-Chase Untersuchung durchgeführt wie nach 2,5 min CHI-Vorinkubation. Die Kettenverlängerung in diesen Zellen erfolgt mit der gleichen Geschwindigkeit wie in Zellen, die nur 2,5 min mit CHI vorinkubiert waren. Die beiden Chase-Kinetiken unterscheiden sich nur dadurch, daß im Falle der 122,5 min CHI-Vorinkubation die Ablösung der Ketten mit einer Verzögerung von etwa 1 min beginnt. Dieser Effekt dürfte auf einer verlangsamten Aufnahme von Leucin in die Zellen beruhen (siehe Kapitel 2.1.4).

In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, daß sich die Menge der mitochondrialen Ribosomen, bezogen auf mg Zellprotein bzw. mg Mitochondrien-Protein, nach Vergiftung der Zellen mit CHI für mindestens 180 min nicht ändert. Ein Vergleich der spezifischen Radioaktivitäten der naszierenden Polypeptidketten (ausgedrückt in Ipm/OD ribosomale RNA) nach 2,5 und 122,5 min CHI-Vorinkubation ergab folgendes: Die Behandlung der Zellen mit CHI für 120 min bewirkt einen Abfall der spezifischen Radioaktivität auf 18 - 23 %. Gleichzeitig steigt die intrazelluläre Leucinkonzentration etwa um den Faktor 4,5. Um die Menge der naszierenden Polypeptidketten zu ermitteln, muß die spezifische Radioaktivität mit diesem Faktor multipliziert werden. Somit ergibt sich, daß die Menge der naszierenden Polypeptidketten in den Mitochondrien während der Behandlung mit CHI für mindestens 120 min konstant bleibt.

Abb. 7 (Seite 26)

Saccharosedichtegradientenzentrifugation von mitochondrialen Ribosomen nach 2,5 min (A) und 62,5 min (B) CHI-Vorinkubation der Zellen. Die den Ribosomen anhängenden Peptidketten wurden durch Inkubation ganzer Zellen mit 3-H Leucin markiert (siehe Text).

_____ : A₂₆₀ ; ---- : Radioaktivität
Monosom Fraktion : 14
Disom Fraktion : 19
Trisom Fraktion : 23



Eine Bestätigung dafür, daß die mitochondriale Translation auch nach längeren Zeiten CHI-Inkubation noch funktioniert, findet sich in Abb. 7. Zellen wurden 2,5 bzw. 62,5 min in CHI vorbehandelt, mit radioaktivem Leucin pulsmarkiert und daraus die mitochondrialen Ribosomen isoliert. Diese wurden einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen, um die Verteilung der naszierenden Polypeptidketten auf monomere und polymere Ribosomen zu untersuchen. Die Profile der Absorption bei 260 nm und die Verteilung der Radioaktivität über die Gradienten zeigen keine bedeutsamen Unterschiede. In beiden Fällen findet sich der Hauptteil der naszierenden Polypeptidketten im Bereich der Polysomen. Somit scheint der Funktionszustand der mitochondrialen Ribosomen nach längerer CHI-Exposition erhalten.

In Abb. 8 ist der Einbau von Radioaktivität in naszierende Polypeptidketten an mitochondrialen Ribosomen dem Einbau in das Protein ganzer Zellen und Mitochondrien gegenübergestellt. Dazu wurden Zellen nach verschiedenen Vorinkubationszeiten mit CHI mit 3-H Leucin von hoher spezifischer Radioaktivität 5 min pulsmarkiert. Aus einem Teil der Proben wurden mitochondriale Ribosomen sofort isoliert. Ein zweiter Teil wurde einem 10 min Leucin chase ausgesetzt. Dann wurde in dieser Probe der Einbau in das Protein ganzer Zellen, von Mitochondrien und von mitochondrialen Membranen gemessen. Sämtliche Werte wurden mit den intrazellulären Leucinpools (Abb. 2) korrigiert. Wie nach den Ausführungen zu Abb. 6 zu erwarten, ist die in naszierenden Polypeptidketten vorhandene Leucinmenge der mitochondrialen Ribosomen während der untersuchten Zeit der CHI-Behandlung konstant. Aber auch der Einbau von Leucin in das Protein ganzer Zellen ist unabhängig von der CHI-Vorinkubationsdauer. Der Einbau in die Mitochondrien und in die mitochondrialen Membranen nimmt mit zunehmender CHI-Vorinkubation ab, und zwar während der ersten 30 min auf etwa die Hälfte, um dann während der folgenden 120 min nur mehr gering abzufallen.

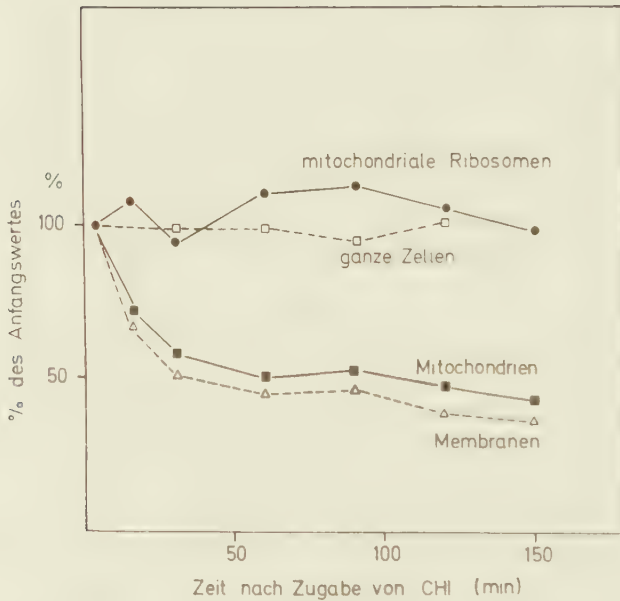


Abb. 8

Einfluß der CHI-Vorinkubation auf den Einbau von Radioaktivität in verschiedene Zellfraktionen:

- a) naszierende Polypeptidketten an mitochondriale Ribosomen;
- b) Protein ganzer Zellen;
- c) Protein isolierter Mitochondrien;
- d) Protein mitochondrialer Membranen.

Ganze Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten mit 3-H Leucin pulsmarkiert. Sämtliche Werte wurden mit den intrazellulären Leucin-Pools (siehe Abb. 2) korrigiert. Alle Werte sind auf den Einbau nach 2,5 min CHI-Vorinkubation (= 100 %) bezogen.

Eine mögliche Erklärung für diese Erscheinung ist folgende:

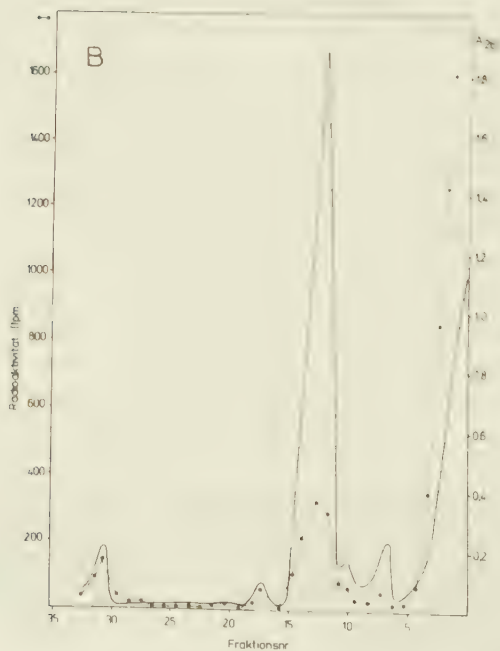
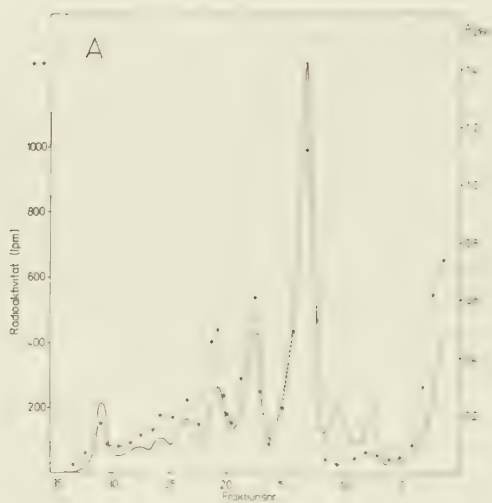
Die mitochondrialen Ribosomen produzieren mit konstanter Geschwindigkeit Polypeptidketten. Aber nur ein Teil dieser Ketten kann in die mitochondriale Membran integriert werden. Es kann vermutet werden, daß der nicht integrierbare Teil einem proteolytischen Abbau unterworfen ist. Nicht ausgeschlossen ist es, daß gleichzeitig nach längerer CHI-Inkubation ein Teil der cytoplasmatischen Ribosomen wieder anfängt, Polypeptide herzustellen und damit die Menge an inkorporierter Radioaktivität in ganze Zellen konstant gehalten wird. Eine weitere Analyse dieser Beobachtung soll in den folgenden Kapiteln erfolgen.

2.1.6. Translation an den cytoplasmatischen Ribosomen in Gegenwart von CHI.

Um zu prüfen, ob an cytoplasmatische Ribosomen in Gegenwart von CHI Polypeptide gemacht werden, wurden Zellen nach 2,5 min, 62,5 min und 122,5 min CHI-Vorinkubation mit radioaktivem Leucin (51 Ci/mMol) jeweils 45 min markiert. Die Zellen wurden durch Reiben mit Quarzsand und Mg^{++} -haltigem Isolierungsmedium aufgeschlossen (vgl. Meth.) Nach Abzentrifugation der Zellwände und Mitochondrien wurden cytoplasmatische Ribosomen aus dem Überstand isoliert und in einen Saccharosedichtegradienten zentrifugiert. Abb. 9A zeigt die Radioaktivität bzw. die optische Dichte bei 260 nm in den einzelnen Fraktionen nach 2,5 min CHI-Vorinkubation der Zellen. Deutlich ist erkennbar, daß die Radioaktivität

Abb. 9 (Seite 30)

Nachweis der Translation an cytoplasmatischen Ribosomen in Gegenwart von CHI. Saccharosedichtegradientenprofil von cytoplasmatischen Ribosomen vor (A) und nach (B) der Behandlung mit Puromycin in einem zellfreien System. Die den Ribosomen anhängenden Peptidketten wurden durch Inkubation ganzer Zellen für 45 min in Gegenwart von CHI mit 3-H Leucin markiert. CHI-Vorinkubation : 2,5 min; — : A_{260} ; ---- : Radioaktivität.



mit den monomeren bzw. polymeren Ribosomen assoziiert ist. Abb. 9B zeigt, daß nach Behandlung der cytoplasmatischen Ribosomen mit Puromycin, das die Ablösung von naszierenden Polypeptidketten bewirkt (24, 38), die Radioaktivität an den Ribosomen verschwindet und am Auftrag des Gradienten erscheint. Nach Untersuchungen an cytoplasmatischen Ribosomen aus Zellen, die 62,5 min bzw. 122,5 min mit CHI vorinkubiert wurden, können die gleichen Beobachtungen gemacht werden. Auch der Einsatz 10-fach höherer CHI-Konzentrationen verhindert nicht die radioaktive Markierung der naszierenden Polypeptidketten an cytoplasmatischen Ribosomen. Das bedeutet, daß in Neurospora-Zellen eine Translation an den cytoplasmatischen Ribosomen in Gegenwart von CHI wahrscheinlich unvermeidbar ist.

Tabelle 3A (S. 36) gibt an, daß sich 9 - 20 % der gesamten eingebauten Radioaktivität in naszierenden Polypeptidketten an cytoplasmatischen Ribosomen befinden. Puls-Chase-Experimente zeigen, daß die Translationsgeschwindigkeit der cytoplasmatischen Ribosomen in Gegenwart von CHI außerordentlich langsam ist. Aus der Abnahme des radioaktiven Leucins in den naszierenden Polypeptidketten läßt sich ein $t_{1/2}$ von etwa 60 - 70 min errechnen. Das ist etwa 1/30 der gemessenen mitochondrialen Translationsgeschwindigkeit (vgl. Kapitel 2.1.4). Hierbei wurde eine Abhängigkeit von der CHI-Vorinkubationszeit nicht beobachtet. Es wurde weiterhin festgestellt, daß eine Markierung der cytoplasmatischen Ribosomen-Proteine nicht erfolgt.

Zur Analyse der naszierenden Polypeptidketten wurden isolierte cytoplasmatische Ribosomen mit SDS desintegriert und einer Gelelektrophorese unterworfen. Abb. 10 A und B zeigen die Auftrennung der in Gegenwart von CHI markierten naszierenden Polypeptidketten. Sowohl nach 2,5 min wie nach 122,5 min CHI-Vorinkubation der Zellen sind im wesentlichen zwei Radioaktivitätsmaxima zu sehen. Eines mit einem scheinbaren Moleku-

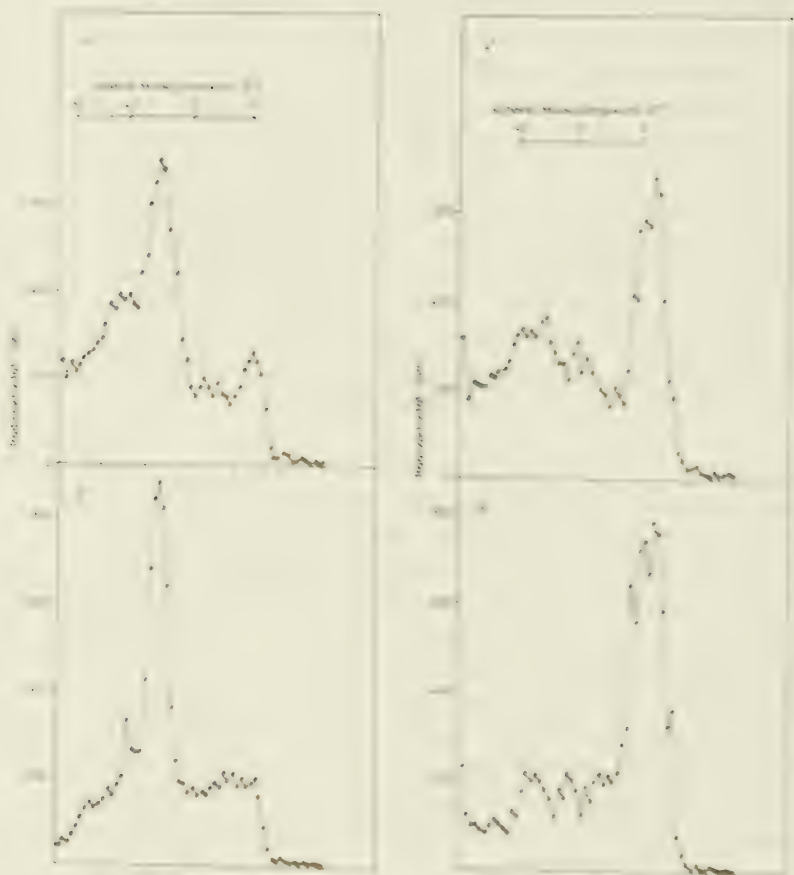


Abb. 10

Polielektrophoretische Analyse der wasserenden Polypeptidketten an polymineralischen Ribosomen. Ganze Zellen wurden nach 7,5 min (A, A') und 11,5 min (B, B') post-Vorinkubation mit radioaktivem Leucin markiert.
 A, B : vor RNase-Behandlung;
 A, B' : nach RNase-Behandlung (0,5 mg/ml).

largewicht zwischen 27000 - 32000, das andere im Molekulargewichtsbereich zwischen 8000 - 12000. Dieses zweite Maximum ist in Abb. 10B nur schwach sichtbar. Behandlung der cytoplasmatischen Ribosomen mit RNase bringt das erste Maximum zum Verschwinden, und das zweite wird entsprechend verstärkt (Abb. 10A' und 10B'). Dieser Befund zeigt, daß der größte Teil der mit den cytoplasmatischen Ribosomen assoziierten Radioaktivität Polypeptidketten mit scheinbaren Molekulargewichten von weniger als 15000 darstellt. Die Polypeptidketten liegen offenbar als Peptidyl-tRNA vor.

Die Beobachtungen dieses Kapitels können wie folgt zusammengefaßt werden:

Cytoplasmatische Ribosomen betreiben auch in Gegenwart von CHI Elongation von Polypeptidketten, wenn auch mit stark verringerter Geschwindigkeit. Unter diesen Bedingungen befinden sich Polypeptidketten als Peptidyl-tRNA an den Ribosomen. Sie haben größtenteils scheinbare Molekulargewichte von weniger als 15000. Diese Erscheinung ist nach längerer CHI-Vorinkubation besonders deutlich ausgeprägt.

Ob in Gegenwart von CHI überhaupt vollständige Polypeptide an den cytoplasmatischen Ribosomen gemacht werden, ist unklar. Ungefähr 20 % aller Proteine in Neurospora-Zellen besitzen scheinbare Molekulargewichte unter 15000 (vgl. später Abb. 40). Die Versuchsergebnisse weisen darauf hin, daß weder Proteine der cytoplasmatischen Ribosomen noch cytoplasmatisch gebildete Mitochondrienproteine (siehe später u.a. Abb. 15) in Gegenwart von CHI mit radioaktivem Leucin markiert werden. Zusammengenommen sind das etwa 40 - 45 % der cytoplasmatisch synthetisierten Proteine von Neurospora-Zellen. Das bedeutet, daß wahrscheinlich keine vollständigen Polypeptidketten gemacht werden.

2.1.7. Subzelluläre Lokalisation der in Gegenwart von CHI gebildeten Translationsprodukte.

Die vorausgehenden Untersuchungen haben ergeben, daß sowohl an den cytoplasmatischen als auch an den mitochondrialen Ribosomen Polypeptide in CHI vergifteten Zellen synthetisiert werden. In diesem Kapitel wird die Verteilung der in Gegenwart von CHI inkorporierten Radioaktivität auf verschiedene Zellfraktionen untersucht.

Tabelle 3 (S. 36) zeigt, daß nach 2,5 min CHI-Vorinkubation etwa 75 % der in ganze Zellen eingehauten Radioaktivität mit den Mitochondrien isoliert werden. Dieser Anteil nimmt nach 62,5 min CHI-Inkubation auf etwa 37 % ab und ändert sich bei längerer Inkubation nicht. Gleichzeitig steigt der Anteil der Radioaktivität im postmitochondrialen Überstand von etwa 16 % (nach 2,5 min CHI-Inkubation) auf 35 bzw. 38 % (nach 62,5 min bzw. 122,5 min CHI-Inkubation). Die in naszierenden Polypeptidketten an cytoplasmatischen Ribosomen eingehaute Radioaktivität nimmt nach längerer CHI-Inkubation um den Faktor 2 zu. Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Zunahme an Radioaktivität in Polypeptiden im postmitochondrialen Überstand durch eine gesteigerte Proteinsynthese an den cytoplasmatischen Ribosomen verursacht werden könnte. Die markierten Polypeptide im postmitochondrialen Überstand stammen nicht von Mitochondrien-Bruchstücken. Dies wird dadurch bestätigt, daß nur etwa 3 - 5 % der Succinatdehydrogenase (Leitenzym der Mitochondrien) im Überstand gefunden wird. Es ist vorstellbar, daß die Zunahme an radioaktiven Polypeptiden im Überstand durch Polypeptide mitochondrialen Ursprungs mitverursacht wird. Oben (Kapitel 2.1.5. und 2.1.6.) wurde aufgezeigt, daß die Translationsgeschwindigkeit der mitochondrialen und cytoplasmatischen Ribosomen nach unterschiedlicher CHI-Inkubation der Zellen konstant bleibt.

Zur Untersuchung, welchen Beitrag die cytoplasmatische Proteinsynthese in Gegenwart von CHI an der gesamten Proteinsynthese

leistet, wurde die mitochondriale Proteinsynthese durch Chloramphenicol (CAP) gehemmt. CAP hemmt die Transpeptidierung an prokaryotischen 70 S Ribosomen und an mitochondrialen Ribosomen von eukaryotischen Zellen (24, 39, 40).

In Gegenwart von CAP (und CHI) wird weniger radioaktives Leucin in Mitochondrienproteine eingebaut als in Abwesenheit von CAP: Tabelle 3 zeigt, daß nur 5,5 - 10 % eingebaut werden. Die Untersuchung ganzer Zellen zeigt, daß in Gegenwart von CAP (und CHI) die Abnahme an eingebautem radioaktiven Leucin nur 48 - 63 % beträgt. Tabelle 3B zeigt, daß hauptsächlich im postmitochondrialen Überstand und an cytoplasmatischen Ribosomen radioaktive Polypeptide gefunden werden. Es wird gleich viel Radioaktivität in diesen Fraktionen registriert wie in Abwesenheit von CAP. Lediglich nach kurzer CHI Vorinkubation der Zellen (2,5 min) wird doppelt soviel Radioaktivität im postmitochondrialen Überstand gefunden wie in Abwesenheit von CAP.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß an mitochondrialen Ribosomen in Gegenwart von CAP (und CHI) noch Polypeptide hergestellt werden. Durchschnittlich findet man, daß 75 - 80 % weniger radioaktives Leucin in naszierende Polypeptidketten eingebaut werden als in Abwesenheit von CAP. Dies bedeutet, daß CAP die Translation an mitochondrialen Ribosomen von Neurospora-Zellen nur unvollständig hemmt. CAP ist folglich zur Beantwortung der Frage, ob die in Gegenwart von CHI radioaktiv-markierten Polypeptide im postmitochondrialen Überstand ausschließlich an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet werden, nicht geeignet. Im nächsten Kapitel wird diese Frage nach gelelektrophoretischer Analyse der in Gegenwart von CHI markierten Polypeptide weiter untersucht.

Tabelle 3: Subzelluläre Lokalisation der in Gegenwart von CHI gebildeten Translationsprodukte. Die Zellen wurden mit CHI (und CAP, 4 mg/ml) vorbehandelt und jeweils mit 3-H Leucin (0,3 nMol/mg Zellprotein) 45 min inkubiert. Anschließend wurde ein Leucinase (10 mM) für 10 min zugegeben.

CHI-Vorinkubation (min)	Radioaktivität in			
	ganzen Zellen	Mitochondrien	postmito. Isol.-Überst.	cytoplasm. Ribosomen
	(% der Gesamtradioaktivität in ganzen Zellen in Abwesenheit von CAP)			

A. in Abwesenheit von CAP

2,5	100	75,2	16,3	9,1
62,5	100	37,4	35,1	20,1
122,5	100	39,3	38,7	18,9

B. in Gegenwart von CAP (Zugabe 15 min vor CHI)

2,5	37,4	4,3	29,7	9,8
62,5	52,7	3,8	39,7	19,3
122,5	48,9	3,9	41,7	22,2

Anmerkung: Die Menge an eingebauter Radioaktivität im post-mitochondrialen Überstand ergibt zusammen mit der Menge in den Mitochondrien nicht 100 %, da nach dem Aufschließen der Zellen nicht alle radioaktiven Polypeptide aus den Hyphen extrahiert werden konnten.

2.1.8. Produkte der Proteinsynthese in Gegenwart von CHI.

2.1.8.1 Gel-elektrophoretische Untersuchung der in Gegenwart von CHI synthetisierten Proteine ganzer Zellen und mitochondrialer Membranen.

Zur Untersuchung der Produkte der Proteinsynthese in Gegenwart von CHI nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten wurden

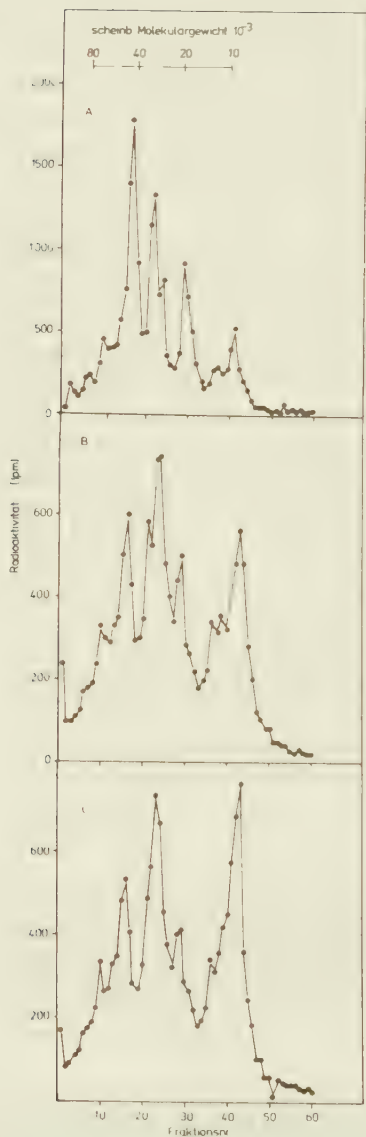
Zellen 2,5 min, 62,5 min und 122,5 min nach Zugabe von CHI mit radioaktivem Leucin (51 Ci/mMol) jeweils 45 min inkubiert. Zur Ablösung der radioaktiven naszierenden Polypeptidketten an den mitochondrialen Ribosomen wurden anschließend 10 mM unmarkiertes Leucin für weitere 10 min zugegeben (vgl. Tabelle 3). Bei der Untersuchung ganzer Zellen wurden die Hyphen sofort mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gemörsert. Die Zellproteine wurden mit SDS-haltigem Puffer eluiert und mit Hilfe der SDS-gel-elektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt. Abb. 11 zeigt, daß die Lage der etwa 10 zu beobachtenden Radioaktivitätsmaxima nach allen CHI-Vorinkubationszeiten gleich ist. Die Maxima entsprechen Polypeptiden mit scheinbaren Molekulargewichten zwischen 8000 - 80000. Die quantitative Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Maxima ist jedoch nicht gleich. Das bedeutet, daß die einzelnen Polypeptide nach unterschiedlicher CHI-Inkubation in unterschiedlichen Mengen hergestellt werden. Auffallend ist, daß nach längerer CHI-Vorinkubation (Abb. 11B und C) Produkte mit scheinbaren Molekulargewichten von 8000 - 12000 und von etwa 30000 vermehrt auftreten, während diejenigen mit Molekulargewichten von 42000 und 20000 abnehmen.

Abb. 11 (Seite 38)

Verteilung der Radioaktivität über die Gele nach SDS-gel-elektrophoretischer Auftrennung von ganzen Zellen, die in Gegenwart von CHI radioaktiv markiert wurden. Nach 2,5 min (A), 62,5 min (B), und 122,5 min (C) CHI-Vorinkubation wurden die Zellen jeweils 45 min mit 3-H Leucin inkubiert. Anschließend wurde ein Leucinase für 10 min zugegeben.

Abb. 12 (Seite 39)

SDS-gelelektrophoretische Analyse von isolierten mitochondrialen Membranen, die nach 2,5 min (A), 62,5 min (B) und 122,5 min (C) CHI-Vorinkubation der Zellen in vivo radioaktiv markiert wurden (vgl. Abb. 11).



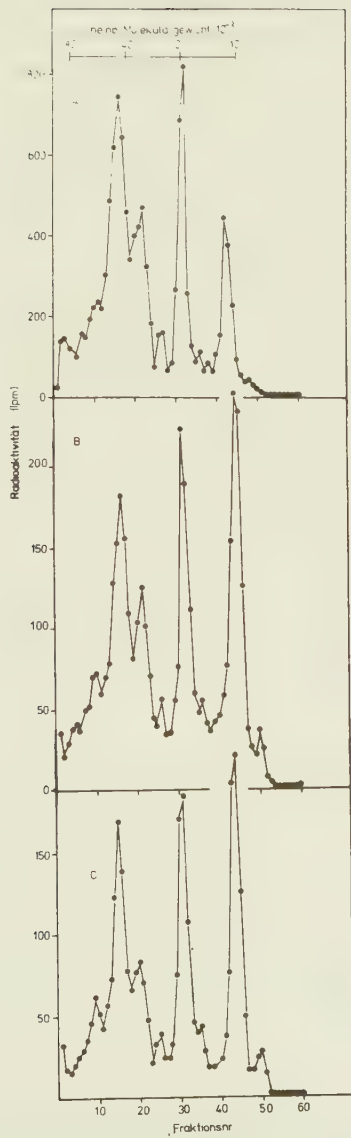


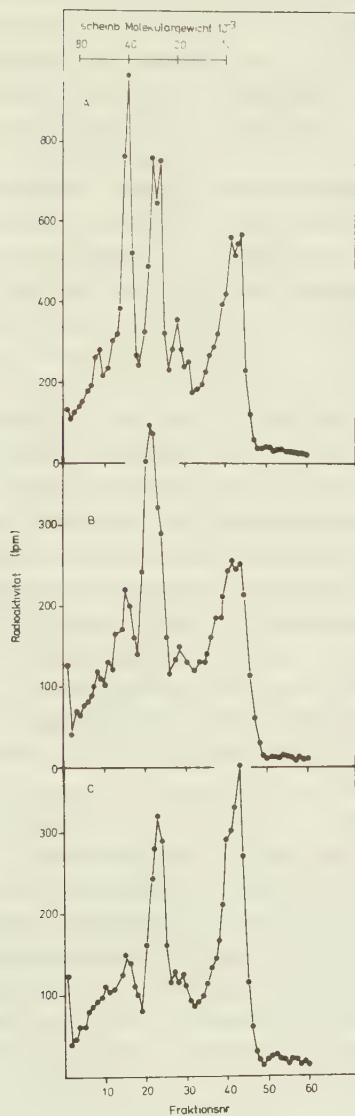
Abb. 12 zeigt die SDS-gel-elektrophoretische Analyse der isolierten mitochondrialen Membranen. Ebenso wie im Falle der ganzen Zellen wird beobachtet, daß die Lage der Radioaktivitätsmaxima auch hier nach unterschiedlichen CHI-Inkubationszeiten gleich ist. Darüber hinaus stimmt die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Maxima weitgehend überein, mit folgenden Einschränkungen: Der relative Anteil der Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 12000 nimmt nach 60 min CHI-Vorinkubation beträchtlich zu; das Verhältnis der Banden mit scheinbaren Molekulargewichten von 30000 und 42000 nimmt im Vergleich zur Bande mit dem Molekulargewicht von 19000 ab. Offensichtlich werden nach den verschiedenen CHI-Behandlungszeiten der Zellen im wesentlichen dieselben Produkte gebildet und in die Mitochondrien-Membran integriert.

Mitochondrien und mitochondriale Membranen zeigen keine Unterschiede im gel-elektrophoretischen Radioaktivitätsmuster. Da weiterhin in der löslichen Fraktion der Mitochondrien keine signifikanten Mengen an radioaktiv-markierten Proteinen gefunden werden, bedeutet das, daß alle im Mitochondrium vorhandenen Proteine in die Mitochondrien-Membran integriert sind.

Vergleicht man die gel-elektrophoretischen Muster ganzer Zellen (Abb. 11) und mitochondrialer Membranen (Abb. 12), so sieht man, daß ein Teil der in Gegenwart von CHI markierten Proteine nicht zusammen mit der mitochondrialen Membran isoliert wird. Dieser Teil beträgt unter den angegebenen Bedingungen nach 2,5 min CHI-Vorinkubation etwa 25 % der Gesamtmarkierung, und liegt nach 30minütiger und längerer CHI-Inkubation bei 55 - 60 % (siehe auch Tabelle 3).

Abb. 13 (Seite 41)

SDS-gelelektrophoretische Analyse des postmitochondrialen Überstandes von Zellen, die nach 2,5 min (A), 62,5 min (B), und 122,5 min (C) CHI-Vorinkubation radioaktiv markiert wurden (vgl. Abb. 11).



Die gel-elektrophoretische Analyse der im postmitochondrialen Überstand befindlichen radioaktiv markierten Polypeptide ist in Abb. 13 dargestellt. Die Radioaktivitätsmuster unterscheiden sich deutlich von denjenigen der mitochondrialen Membranen. Diese Unterschiede sind weniger ausgeprägt nach kurzer CHI-Inkubation der Zellen als nach längerer. Im letzten Fall finden sich im wesentlichen Produkte mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 8000 - 14000 und von 30000. Daneben befindet sich ein großer Teil der Radioaktivität diffus verteilt über den gesamten Radioaktivitätsbereich. Die Muster von postmitochondrialen Überständen und von mitochondrialen Membranen ergänzen sich zum Muster ganzer Zellen.

In Kapitel 2.1.6 wurde gezeigt, daß naszierende Polypeptidketten an cytoplasmatische Ribosomen in Gegenwart von CHI radioaktiv markiert werden. Diese Ketten liegen nach SDS-Elektrophorese zum größten Teil als Peptidyl-tRNA vor mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 27000 - 32000. Nach RNase-Behandlung entstanden Polypeptidketten mit scheinbaren Molekulargewichten von weniger als 15000 (vgl. Abb. 10). Ähnlich kann man durch RNase-Behandlung ganzer Zellen (Abb. 11) und des postmitochondrialen Überstandes (Abb. 13) das Radioaktivitätsmaximum im Molekulargewichtsbereich um 30000 verringern bzw. zum Verschwinden bringen (Abb. 14). Das Maximum im Molekulargewichtsbereich von 8000 - 14000 wird dadurch verstärkt. Das bedeutet, daß die Zunahme der Radioaktivitätsbande im Molekulargewichtsbereich zwischen 27000 - 32000 nach längeren CHI-Vorinkubationszeiten auf einen vergrößerten Anteil an Radioaktivität in den naszierenden Polypeptidketten der cytoplasmatischen Ribosomen zurückzuführen ist. Dieser Befund stimmt mit dem Ergebnis in Tabelle 3 (S. 36) überein.

Anhand der Abb. 14C und D wird weiter sichtbar, daß der größte Teil der im postmitochondrialen Überstand vorhandenen Radioaktivität in Polypeptiden mit einem scheinbaren Molekulargewicht von weniger als 15000 inkorporiert ist. Daneben befindet sich Radioaktivität von kontaminierenden Mitochondrien. Dies ist besonders ausgeprägt in Abb. 14C nach kurzer CHI-Vorinkubation der Zellen.

Die gel-elektrophoretische Untersuchung der Translationsprodukte, die in Gegenwart von CAP und CHI radioaktiv markiert werden, wird in Abb. 15 gezeigt (vgl. Tabelle 3). Zellen wurden vor der Zugabe von CHI 15 min mit CAP vorinkubiert. Nach 2,5 min CHI-Inkubation wurde radioaktives Leucin zugegeben (vgl. auch Tabelle 3). Abb. 15B zeigt, daß gelelektrophoretisch aufgetrennte Mitochondrienproteine keine definierten Radioaktivitätsbanden aufweisen. Die Radioaktivität ist gleichmäßig über das Gel verteilt. Bei ganzen Zellen (Abb. 15A) sieht man deutlich zwei Radioaktivitätsmaxima mit scheinbaren Molekulargewichten von etwa 30000 und 8000 - 13000. Das erste Maximum kann durch RNase-Behandlung zum Verschwinden gebracht werden. Das zweite Maximum nimmt dann entsprechend zu. Dies besagt, daß das erste Maximum Peptidyl-tRNA an cytoplasmatischen Ribosomen darstellt. Das Markierungsmuster ganzer Zellen in Abb. 15 ähnelt dem Muster des postmitochondrialen Überstandes nach längerer CHI-Inkubation der Zellen (vgl. Abb. 13B und C).

Die Analyse der Translationsprodukte aus Zellen, die nach 62,5 min und 122,5 min CHI-Vorinkubation in Gegenwart von CAP mit radioaktivem Leucin markiert wurden, zeigt das gleiche Ergebnis wie nach 2,5 min CHI-Vorinkubation. Zusammengefaßt bedeutet dieser Befund folgendes:

Translationsprodukte, die in Gegenwart von CAP und CHI an den cytoplasmatischen bzw. mitochondrialen Ribosomen gemacht werden, werden in die mitochondriale Membran nicht

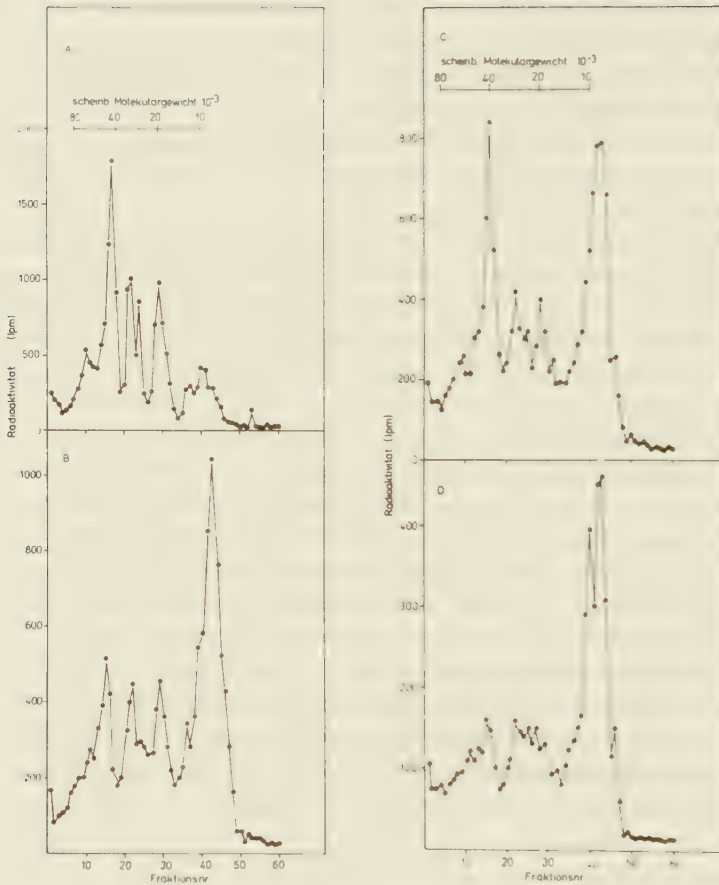


Abb. 14

SDS-gel-elektrophoretische Analyse von ganzen Zellen und des postmitochondrialen Überstandes nach RNase-Behandlung (0,5 mg/ml). Ganze Zellen wurden in Gegenwart von CHI wie in Abb. 11 radioaktiv markiert.

A : ganze Zellen nach 2,5 min CHI-Vorinkubation (vgl. Abb. 11A);

B : ganze Zellen nach 122,5 min CHI-Vorinkubation (vgl. Abb. 11C);

C : postmitochondrialer Überstand nach 2,5 min CHI-Vorinkubation der Zellen (vgl. Abb. 13A);

D : postmitochondrialer Überstand nach 122,5 min CHI-Vorinkubation der Zellen (vgl. Abb. 13C).

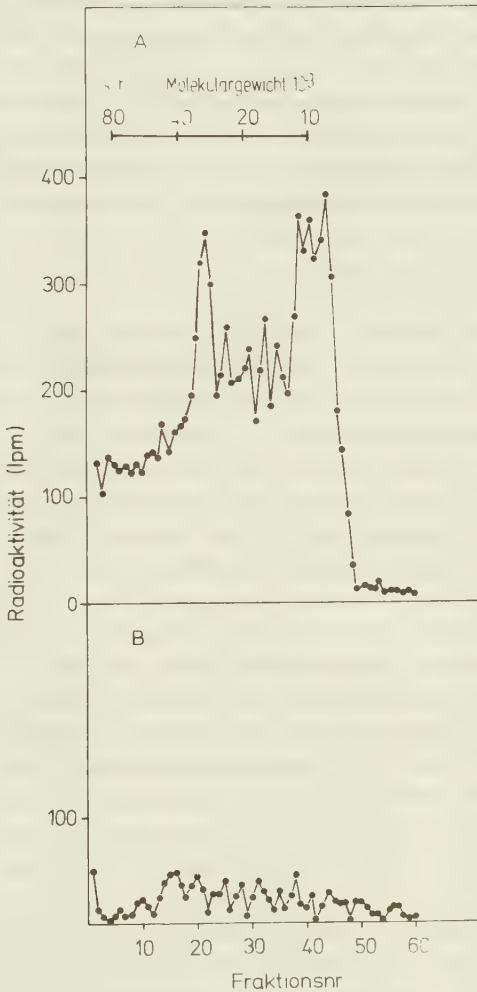


Abb. 15

SDS-gel-elektrophoretische Analyse von ganzen Zellen (A) und isolierten Mitochondrien (B), die nach 15 min CAP und 2,5 min CHI Vorinkubation der Zellen wie in Abb. 11 radioaktiv markiert wurden.

integriert. Es werden in beiden Fällen hauptsächlich Polypeptide mit einem scheinbaren Molekulargewicht von weniger als 15000 hergestellt, das heißt, daß in Gegenwart von CHI und CAP wahrscheinlich weder an den cytoplasmatischen noch an den mitochondrialen Ribosomen vollständige Translationsprodukte hergestellt werden. Dies schlägt vor, daß in Gegenwart von CHI (ohne CAP) an den cytoplasmatischen Ribosomen auch keine vollständigen Translationsprodukte gebildet werden (vgl. oben Kapitel 2.1.6.).

Die Beobachtungen dieses Kapitels können mit den Befunden der letzten Kapitel wie folgt zusammengefaßt werden: Nach Vergiftung der Zellen mit CHI bleibt die Translation an mitochondrialen Ribosomen für mindestens eine halbe Verdopplungsperiode der Zellen erhalten. Es werden mit gleicher Geschwindigkeit wahrscheinlich die gleichen Translationsprodukte hergestellt. Ein Teil dieser Produkte wird nach längerer CHI-Inkubation nicht mehr in die mitochondriale Membran integriert. Das Schicksal der nicht integrierten Translationsprodukte ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich werden sie begrenzt abgebaut und verlassen das Mitochondrium in vivo oder beim Isolieren. Denkbar ist jedoch auch, daß diese Produkte vollständig abgebaut werden, da nicht geklärt ist, ob die im postmitochondrialen Überstand befindlichen neu gebildeten Polypeptide in Gegenwart von CHI ausschließlich an den cytoplasmatischen Ribosomen gebildet werden. Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch folgender Befund:

Der Leucineinbau in ganze Zellen ist nach kurzer und langer CHI-Inkubation der Zellen annähernd gleich (vgl. Abb. 8 und 16), das heißt, der Abbau mitochondrialer Translationsprodukte müßte durch eine erhöhte Syntheseleistung an den cytoplasmatischen Ribosomen genau kompensiert werden. Die Translationsgeschwindigkeit an cytoplasmatischen und mitochondrialen Ribosomen ist nach kurzer wie nach langer CHI-Inkubation der Zellen jedoch unverändert (vgl. Kapitel 2.1.5, 2.1.6.).

2.1.8.2. Immunopräzipitierbare Komponenten der Cytochromoxidase.

Cytochromoxidase aus *Neurospora*-Zellen besteht aus insgesamt sieben Untereinheiten, die Molekulargewichte von etwa 41000, 28000, 21000, 16000, 14000, 10000 und 9000 haben (35). Die vier kleineren Untereinheiten werden an den cytoplasmatischen Ribosomen gebildet. Die drei größeren Untereinheiten, 1 - 3, sind mitochondrialen Ursprungs. Dies folgt aus Experimenten, in denen Zellen kurze Zeit mit CHI vorinkubiert und anschließend mit radioaktivem Leucin versetzt wurden. Dabei wurde beobachtet, daß die drei größeren Untereinheiten radioaktiv markiert wurden (18, 41, 42). Im folgenden wird untersucht, ob die mitochondrial gebildeten Untereinheiten der Cytochromoxidase nach längerer Blockierung der Synthese der cytoplasmatisch gebildeten Partner-Untereinheiten noch hergestellt werden. Die Isolierung dieser Untereinheiten erfolgte mit einem Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase.

Hyphen wurden mit ^{14}C Leucin homogen markiert. Wie im letzten Kapitel beschrieben, wurde dann nach 2,5 min, 62,5 min und 122,5 min CHI-Vorinkubation ^3H Leucin für 45 min zum Kulturmedium gegeben. Anschließend wurden die Zellen 10 min und 60 min mit unmarkiertem Leucin (10 mM) inkubiert, um die Stabilität der markierten Produkte zu prüfen.

Sowohl ganze Zellen, als auch isolierte Mitochondrien wurden mit dem Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase behandelt. Die Ergebnisse unterscheiden sich nach 10 min bzw. 60 min Leucinchase nicht:

- a) Homogene Markierung. Durchschnittlich kann aus ganzen Zellen 0,6 - 0,7 % des eingebauten ^{14}C Leucins präzipitiert werden. Aus isolierten Mitochondrien werden etwa 2,8 - 3,3 % gefällt. Da etwa 20 - 25 % des zugegebenen ^{14}C Leucins in

Mitochondrien eingebaut werden (Kapitel 2.1.3.), bedeutet dies, daß aus ganzen Zellen und aus isolierten Mitochondrien qualitativ etwa gleich viel Cytochromoxidase gefällt wird.

- b) Spezifische Markierung in Gegenwart von CHI. Aus ganzen Zellen werden nach 2,5 min CHI-Vorinkubation etwa 14 - 15 % des eingebauten 3-H Leucins präzipitiert. Nach langen CHI-Vorinkubationszeiten (62,5 min und 122,5 min) wird nur etwa die Hälfte (7,2 - 7,6 %) gefällt. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund in Tabelle 3 (S. 36) überein. Dort wurde aufgezeigt, daß nach langen CHI-Inkubationszeiten auch nur halb soviel Leucin in die Mitochondrien integriert wird wie nach 2,5 min CHI-Vorinkubation.

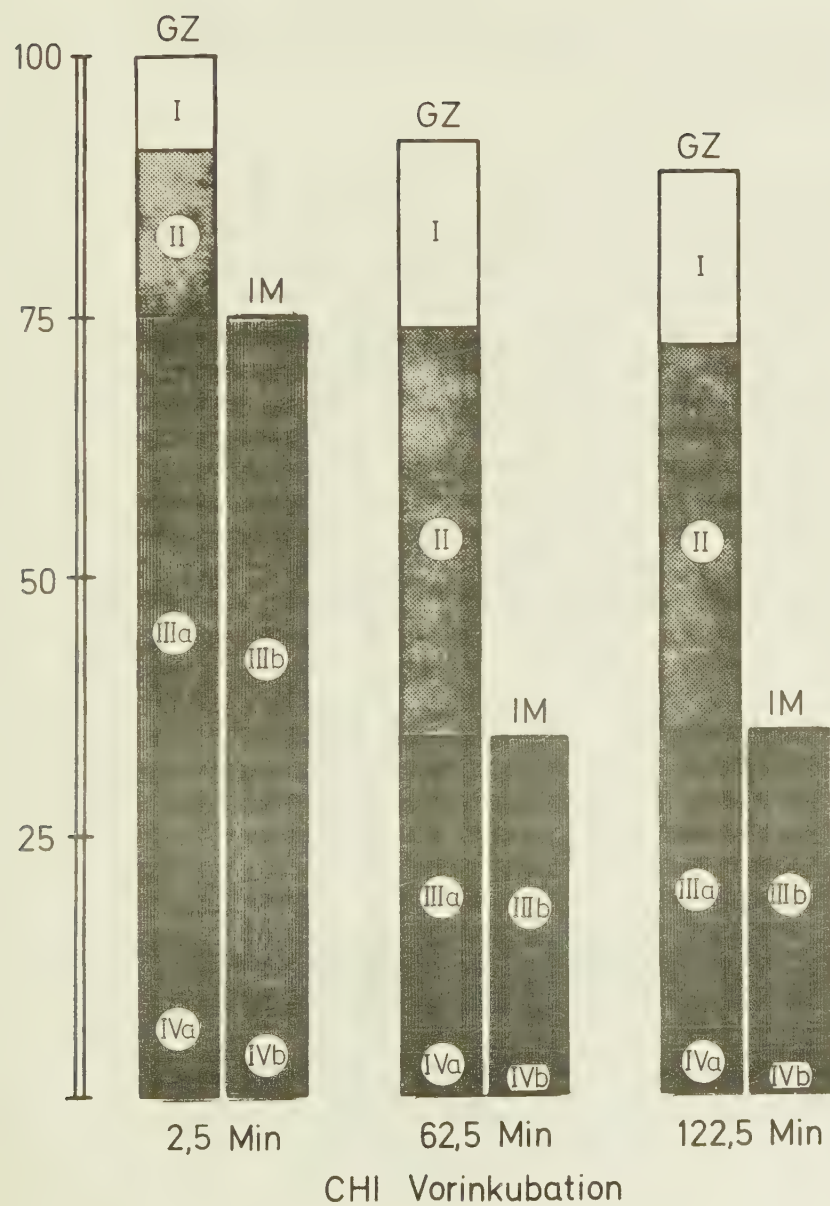
Die aus isolierten Mitochondrien präzipitierbare Radioaktivität ist geringer als die präzipitierbare Radioaktivität aus ganzen Zellen. Dies ist aus Abb. 16 ersichtlich. Darin ist dargestellt, wieviel in Polypeptide eingebautes Leucin in welchen Zellfraktionen nach unterschiedlicher CHI-Vorinkubation gefunden wird (vgl. auch Tabelle 3, S. 36): Der Anteil an (3-H) Leucin, der in immunpräzipitierbare Cytochromoxidase-Untereinheiten inkorporiert wird, steht immer im gleichen Verhältnis zu der in Mitochondrien integrierten (3-H) Leucinmenge, wenn aus ganzen Zellen präzipitiert wird.

Abb. 16 (Seite 49)

Leucineinbau in verschiedene Zellproteine nach Zugabe von CHI in vivo (vgl. Tabelle 3): GZ: ganze Zellen; IM: isolierte Mitochondrien.

- I. naszierende Polypeptidketten an cytoplasmatischen Ribosomen;
- II. Polypeptide im postribosomalen Überstand;
- III. a und b: Mitochondrienproteine;
- IV. immunpräzipitierbare Untereinheiten der Cytochromoxidase
 - a. aus ganzen Zellen
 - b. aus isolierten Mitochondrien.

Ganze Zellen wurden nach den angegebenen CHI-Vorinkubationszeiten mit 3-H Leucin (0,3 nMol/mg Zellprotein) 45 min inkubiert. Anschließend wurde ein Leucinchase (10 mM) für 10 min zugegeben. Der Leucineinbau wurde mit Hilfe der intrazellulären Leucinpools (Abb. 2) errechnet.



Dieser Anteil beträgt etwa 19,5 %. Aus isolierten Mitochondrien wird stets weniger gefällt. (Die Interpretation dieses Ergebnisses erfolgt nach der qualitativen Analyse der Immunopräzipitate).

Die gelelektrophoretische Analyse der Immunopräzipitate aus ganzen Zellen ist in Abb. 17 dargestellt. Das spezifische Markierungsmuster zeigt nach allen CHI-Vorinkubationszeiten drei Radioaktivitätsmaxima in identischer Lage. Sie entsprechen den Untereinheiten 1 - 3 der Cytochromoxidase. Nach längeren CHI-Vorinkubationszeiten (62,5 min und 122,5 min) nimmt die radioaktive Markierung in Untereinheit 1 im Verhältnis zu den Untereinheiten 2 und 3 ab (Faktor 2,5). Die relative Markierung der Untereinheiten 2 und 3 verändert sich dagegen nur wenig. Die Radioaktivität im Molekulargewichtsbereich unter 18000 stellt wahrscheinlich eine Verunreinigung dar. Das homogene Markierungsmuster zeigt alle sieben Untereinheiten der Cytochromoxidase. Es ist nach allen CHI-Inkubationszeiten gleich.

Abb. 17 (Seite 51)

SDS-gelelektrophoretische Analyse immunopräzipitierbarer Untereinheiten der Cytochromoxidase aus ganzen Zellen.
Homogen mit $^{14}\text{-C}$ Leucin markierte Zellen wurden in Gegenwart von CHI mit $^3\text{-H}$ Leucin markiert wie in Abb. 11 beschrieben:

(A): 2,5 min, (B): 62,5 min, (C): 122,5 min CHI-Vorinkubation der Zellen.

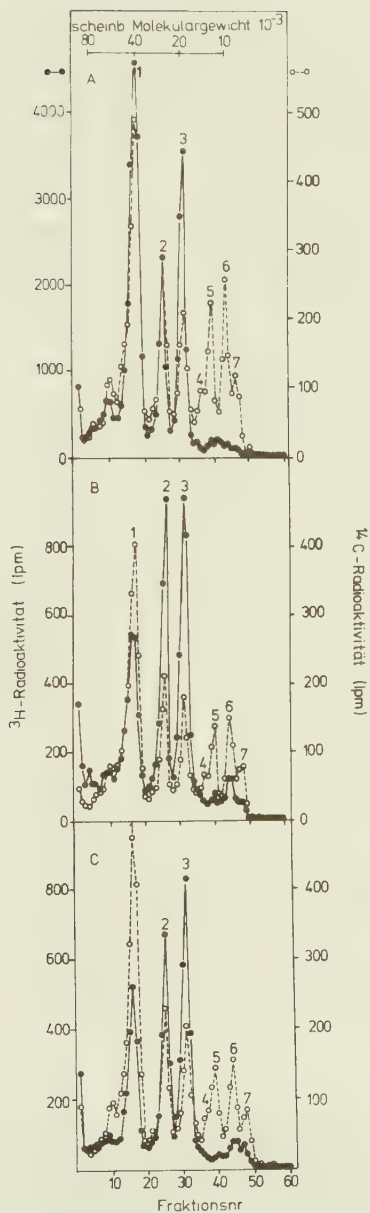
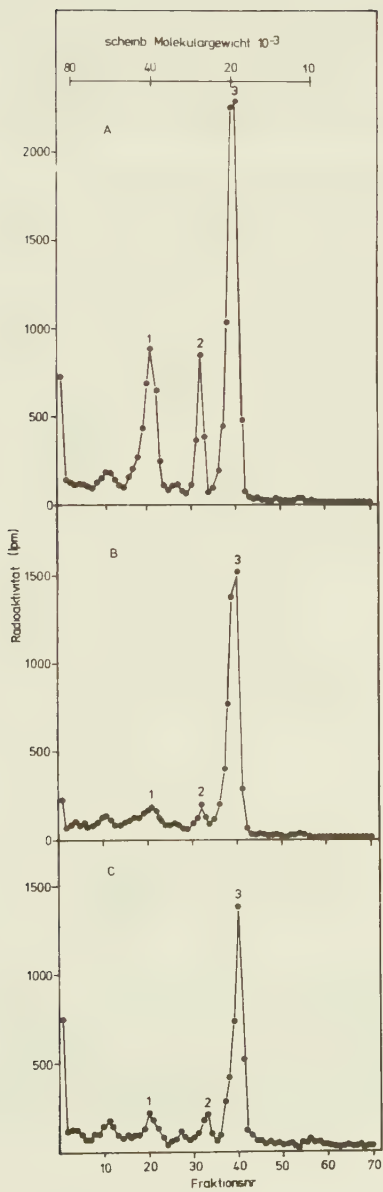


Abb. 18 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Immunopräzipitate aus isolierten Mitochondrien. Das homogene Markierungsmuster unterscheidet sich nicht von demjenigen der Fällung aus ganzen Zellen (in Abb. 18 nicht gezeigt, vgl. später Abb. 31, 38 und 40). Das spezifische Markierungsmuster (in Gegenwart von CHI eingebautes radioaktives Leucin) unterscheidet sich erheblich von demjenigen ganzer Zellen. Nach allen CHI-Inkubationszeiten ist in Untereinheit 1 und 2 der Cytochromoxidase wesentlich weniger Radioaktivität. Lediglich das in Untereinheit 3 eingebaute radioaktive Leucin wird vom Antikörper in etwa dem gleichen Ausmaß gefällt wie im Fall ganzer Zellen (vgl. Abb. 18 mit Abb. 17). Dieses Ergebnis stimmt mit dem quantitativen Befund (vgl. Abb. 16) überein.

Die Tatsache, daß der Antikörper gegen gesamte Cytochromoxidase die Untereinheiten 1 und 2 aus ganzen Zellen präzipitiert, jedoch nicht aus isolierten Mitochondrien ist überraschend. Die Cytochromoxidase ist ein fest in die Innenmembran der Mitochondrien integriertes Enzym. Komponenten der Cytochromoxidase können mit Antikörper im postmitochondrialen Überstand nicht gefällt werden (vgl. auch Abb. 13). Wurden mit Triton X-100 solubilisierete Mitochondrien vor und nach der Antikörperfällung gelelektrophoretisch untersucht, so ergab sich, daß die Radioaktivitätsmaxima, die in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit den Untereinheiten 1 und 2 der Cytochromoxidase entsprechen, nach Präzipitation nicht abnehmen. Im Fall ganzer Zellen beobachtet man eine starke Abnahme der entsprechenden Banden, jedoch auch kein vollständiges Verschwinden.

Abb. 18 (Seite 53)

SDS-gelelektrophoretische Analyse von immunopräzipitierbaren Untereinheiten der Cytochromoxidase aus isolierten Mitochondrien wurden in vivo nach 2,5 min (A), 62,5 min (B) und 122,5 min (C) CHI-Vorinkubation radioaktiv markiert, wie in Abb. 11 beschrieben.



Diese Beobachtungen können folgendermaßen zusammengefaßt werden: Durch die Isolierung der Mitochondrien verlieren die in Gegenwart von CHI synthetisierten Untereinheiten 1 und 2 der Cytochromoxidase die Fähigkeit, mit Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase zu reagieren. Es gibt mehrere Möglichkeiten, diese Veränderung zu erklären:

- a) Die mitochondrial gebildeten Untereinheiten der Cytochromoxidase können als teilassemblierte Komplexe vorliegen, die wegen der fehlenden cytoplasmatischen Untereinheiten instabil sind und bei der Isolierung der Mitochondrien auseinanderfallen. Diese Annahme würde zum Beispiel erklären, weshalb nach kurzer CHI-Inkubation aus isolierten Mitochondrien teilweise die Untereinheiten 1 und 2 noch präzipitiert werden. Cytoplasmatische Untereinheiten-Pools ermöglichen wahrscheinlich nach Zugabe von CHI, daß für kurze Zeit die Untereinheiten 1 und 2 in einen stabilen immunpräzipitierbaren Komplex integriert werden können (vgl. SCHWAB et al, (43)).
- b) Die mitochondrial gebildeten Untereinheiten können spezifisch, aber unterschiedlich fest an fertig assemblierte Cytochromoxidase gebunden sein. Bei der Isolierung der Mitochondrien würde die Bindung zerstört werden. Dies könnte etwa dann der Fall sein, wenn man annimmt, daß fertig assemblierte Cytochromoxidase einen "Kristallisationskeim" für die Assemblierung darstellt.
- c) Da möglicherweise die freien Untereinheiten 1 und 2 mit dem verwendeten Antikörper reagieren, können bei der Isolierung der Mitochondrien Veränderungen der Konformation spezifisch von diesen Komponenten stattfinden.

Der verwendete Antikörper reagiert nicht mit der isolierten Untereinheit 3 (44). Demnach ist Voraussetzung für die Fällung dieser Untereinheit nach ihrer Synthese in Gegenwart von CHI entweder eine Teilassemblierung im Sinne von a) oder eine spezifische Bindung im Sinne der Erklärung b).

Ein spezifischer Austausch mit der in die vollständig assemblierte Cytochromoxidase integrierten Untereinheit 3 wäre auch vorstellbar. Diese Möglichkeit kann jedoch nur wenig zur Immunopräzipitation der Untereinheit 3 beitragen, da das homogene Markierungsmuster der Cytochromoxidase (vgl. oben Abb. 17) sich in Gegenwart von CHI dann mehr verändern müßte.

2.2. Rolle intrazellulärer Proteinasen bei der Untersuchung der Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese.

2.2.0. Problemstellung.

Die Untersuchung von zellulären Reaktionen nach mechanischer Öffnung der Zellen und Auftrennung in einzelne Zellbestandteile ist eine häufige Maßnahme in der biochemischen Analytik. Derartige Verfahren sind oft von dem Auftreten von Artefakten begleitet, die durch unspezifische Wirkungen intrazellulärer Proteinasen hervorgerufen werden. Deshalb ist die Feststellung wichtig, inwieweit proteolytische Enzyme während der Isolierung von Zellfraktionen eine Umverteilung erfahren. In *Neurospora*-Zellen wurde beobachtet, daß Proteinasen in speziellen Zellorganellen, sog. "Proteinase-Vakuolen", lokalisiert sind (45, 46). Diese Vakuolen werden bei fraktionierter Zentrifugation zusammen mit den Mitochondrien isoliert und können dadurch den Anlaß zu Fehlinterpretationen bilden (47). Im folgenden Teil wurde untersucht, ob und wann unspezifische proteolytische Enzyme mitochondriale Proteine angreifen, und wie ihre Wirkung gehemmt werden kann. Diese Feststellung ist zunächst hinsichtlich der Diskriminierung zwischen der Wirkung spezifischer intramitochondrialer (vgl. oben Kapitel 2.1.8.) und unspezifischer Proteinasen wichtig. Ferner ist die Kenntnis der Wirkung und Hemmung unspezifischer Proteinasen Voraussetzung zum Studium der mitochondrialen Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien (Teil 3).

2.2.1. Nachweis der Wirkung von proteolytischen Enzymen bei der Untersuchung isolierter Mitochondrien.

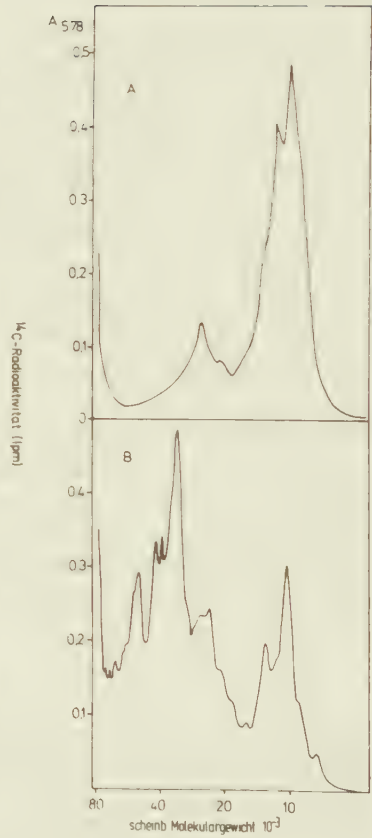
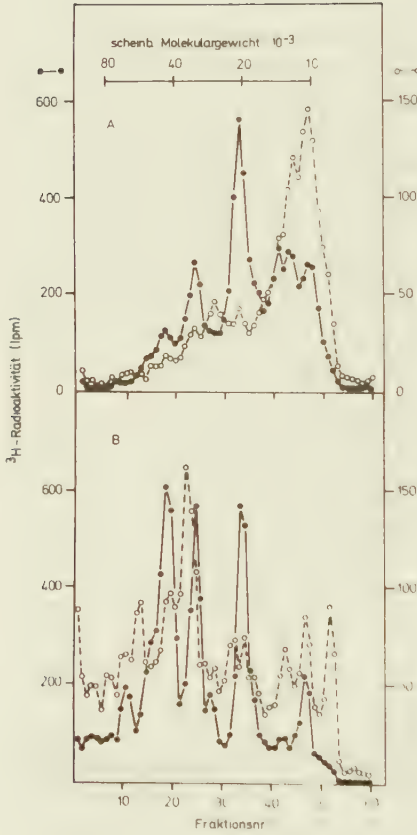
Mitochondrien wurden aus Zellen isoliert, die homogen mit ¹⁴C Leucin und spezifisch in Gegenwart von CHI mit 3-H

Leucin markiert waren. Zur spezifischen Markierung wurden die Zellen 2,5 min mit CHI vorbehandelt, dann 5 min mit 3-H Leucin (0,3 nMol/Zellprotein) und weitere 5 bzw. 60 min mit unmarkiertem Leucin (25000 nMol/mg Zellprotein) inkubiert. Abb. 19 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der isolierten Mitochondrien. Die Radioaktivitätsmuster und die Densitogramme der mit Coomassie-Blue angefärbten Gele sind dargestellt. Wurde nur 5 min mit unmarkiertem Leucin inkubiert, so besitzen die meisten Mitochondrien-Proteine scheinbare Molekulargewichte zwischen 5000 - 20000. Nur ein geringer Anteil der Polypeptide mitochondrialen Ursprungs zeigen höhere Molekulargewichte (größer als 25000). Werden hingegen Mitochondrien erst nach 60 min Inkubation mit unmarkiertem Leucin isoliert und untersucht, so befindet sich der Großteil der Radioaktivität in Polypeptidbanden mit scheinbaren Molekulargewichten zwischen 20000 - 80000.

Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist, daß unter diesen Versuchsbedingungen nach kurzer CHI-Inkubation (insgesamt 12,5 min) ein heftiger proteolytischer Abbau sowohl der cytoplasmatischen wie auch der mitochondrialen Translationsprodukte stattfindet. Dieser Abbau tritt jedoch nicht nach längerer CHI-Inkubation (insgesamt 67,5 min) ein.

Abb. 19 (Seite 58)

SDS-gelelektrophoretische Analyse isolierter Mitochondrien nach unterschiedlich langer Inkubation der Zellen in Gegenwart von CHI. Homogen 14-C markierte Zellen wurden spezifisch nach 2,5 min CHI-Vorinkubation mit 3-H Leucin für 5 min markiert. Anschließend wurden ein Leucinase für weitere 5 min (A, A') bzw. 60 min (B, B') zugegeben.
A, B : die Verteilung der Radioaktivität;
A', B' : Densitogramm der Mitochondrienproteine nach Anfärbung mit Coomassie-Blue (A₅₇₈).



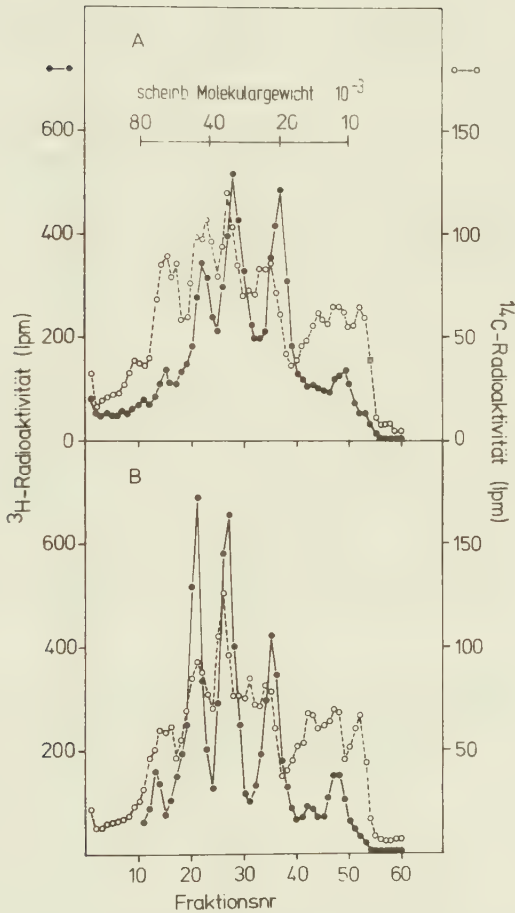


Abb. 20

SDS-gelelektrophoretische Analyse isolierter Mitochondrien nach Behandlung mit dem Proteinase-Inhibitor DFP (Diisopropylfluorophosphat). Die Zellen wurden markiert, wie in Abb. 19 beschrieben: A : 5 min Leucinase; B : 60 min Leucinase.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden isolierte Mitochondrien aus vergleichbaren Ansätzen mit dem Proteinase-Inhibitor DFP (Diisopropylfluorophosphat) behandelt, bevor sie in SDS-haltigem Medium aufgelöst und gelelektrophoretisch untersucht wurden. Abb. 20 zeigt, daß nach DFP-Behandlung die homogene ^{14}C Markierung sowohl nach kurzem wie auch nach langem Leucinase in Gegenwart von CHI hauptsächlich in höhermolekularen Polypeptidbanden vorliegen. Nach 5 min Leucinase erscheint das CHI-resistente Markierungsmuster noch etwas diffus. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß DFP entweder nicht vollständig hemmt oder/und schon vor der Zugabe von DFP ein Abbau stattfindet.

Abb. 21 zeigt in diesem Zusammenhang, daß die Proteinase-Aktivität, die anhand der Hydrolyse von Azocasein nach der Methode von Hazen (48) gemessen wurde, sich erst dann vollständig entfaltet, wenn die Mitochondrien mit Detergentien, wie Triton X-100 (oder SDS), aufgelöst werden. Mitochondrien, die bei 25°C in Saccharose-haltigem, isotonen Inkubationsmedium für 90 min gehalten wurden, zeigen noch keine Anzeichen proteolytischen Abbaus.

Diese Befunde zeigen, daß die Mitochondrienfraktion von Neurospora-Zellen proteolytische Enzyme enthalten, die offenbar nach längerer Inkubation der Zellen in Gegenwart von CHI verschwunden sind. Die volle Wirkung der Proteinase tritt erst nach der Behandlung der Mitochondrien mit Detergentien, wie Triton X-100 und SDS, ein. Mitochondriale Translationsprodukte scheinen nicht so leicht proteolytisch angegriffen zu werden, wie cytoplasmatische. Dies gilt insbesondere für Polypeptide mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 20000 (Abb. 19A).

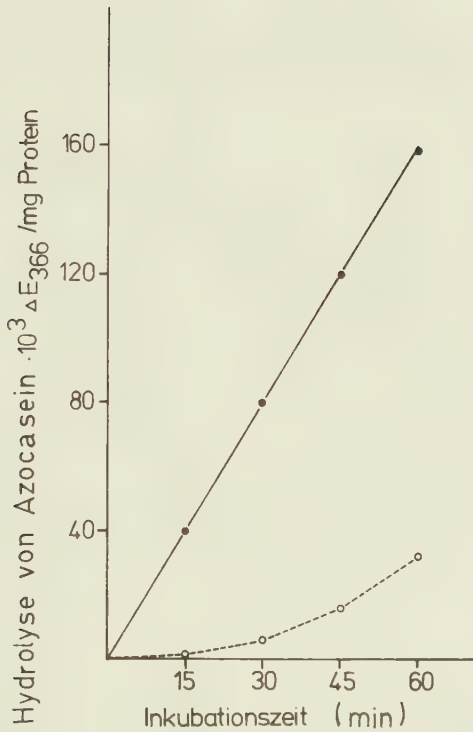


Abb. 21

Proteinase-Aktivität in der Mitochondrienfraktion unbehandelter Zellen in Gegenwart (●—●) und in Abwesenheit (○---○) von Triton X-100. Untersuchungen der Proteinase-Aktivität wurden anhand der Hydrolyse von Azocasein nach der Methode von Hazen durchgeführt (48).

2.2.2. Lokalisation der Proteinase-Aktivität.

Um nachzuweisen, ob die beobachtete proteolytische Aktivität in den Mitochondrien lokalisiert ist oder ob sie auf Kontamination der Mitochondrien beruht, wurde die Mitochondrienfraktion einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Nach der Zentrifugation wurde in der unteren Hälfte des Gradienten eine diffuse Mitochondrienbande beobachtet. Der Proteingehalt und die Proteinase-Aktivität wurden in dem in 10 Fraktionen unterteilten Gradienten und im Pellet untersucht (Abb. 22). Das Proteinprofil zeigt ein Maximum in der Fraktion 7, das Mitochondrien darstellt. Etwa 10 % der eingesetzten Proteinmenge befinden sich in der Pelletfraktion. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität ergibt, daß etwa 85 % der Gesamtaktivität im Pellet lokalisiert ist. Die Mitochondrien in Fraktion 7 besitzen nur mehr 6 - 7 % ihrer ursprünglichen spezifischen Proteinase-Aktivität. Das bedeutet, daß die durch das angewandte Testverfahren nachweisbaren Proteinase offenbar mit Partikel assoziiert sind, die eine höhere Dichte besitzen als Mitochondrien. Das Vorkommen von Proteinase-Vesikel in *Neurospora crassa* mit hoher Dichte ist von MATILE et al (49) beschrieben worden.

Wird die Mitochondrien-Fraktion aus Zellen, die 60 min mit CHI vorbehandelt wurden, derselben Dichtegradientenzentrifugation unterworfen, so stellt sich annähernd die gleiche Proteinverteilung ein wie bei unbehandelten Zellen (Abb. 22). Auch hier kann nur eine sehr geringe Proteinase-Aktivität in der Mitochondrienbande festgestellt werden. Im Pellet nimmt die spezifische Proteinase-Aktivität um 75 % ab. Hieraus kann geschlossen werden, daß *Neurospora*-Zellen nach Behandlung mit CHI weniger Proteinase-haltige Vesikel besitzen. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund in Kapitel 2.2.1. überein, wo gezeigt wurde, daß der proteolytische Abbau mitochondrialer Proteine nach längerer CHI-Inkubation abnimmt.

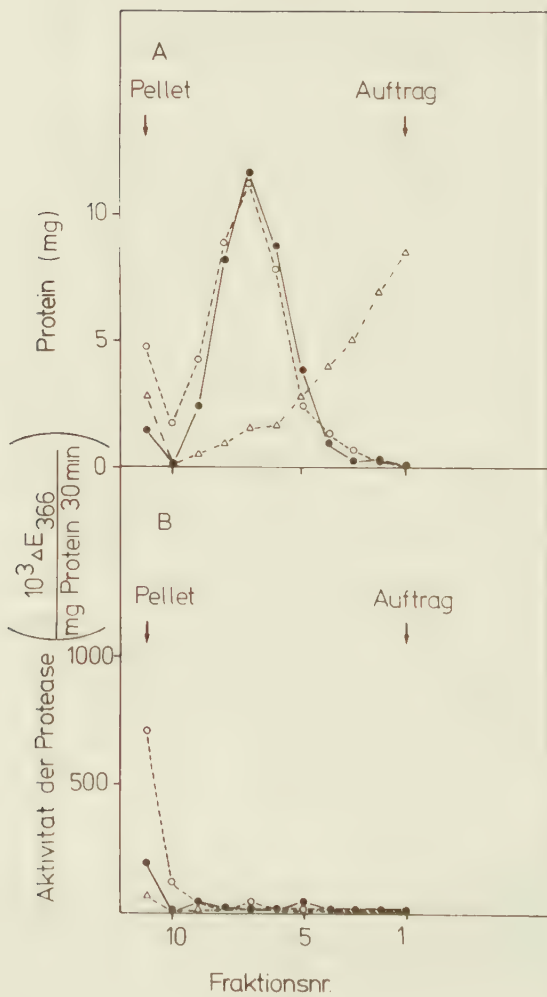
Als Beweis, daß kontaminierende, vesikuläre Proteinasen tatsächlich den Abbau mitochondrialer Proteine verursachen, wurden Mitochondrien vor der SDS-gelelektrophoretischen Analyse über einen Dichtegradienten gereinigt. Es zeigte sich, daß dadurch der Abbau mitochondrialer Proteine weitgehend verhindert wird (Abb. 23).

Eine weitere Möglichkeit, in der Mitochondrienfraktion die Wirkung proteolytischer Enzyme auszuschalten, ergab sich aus der folgenden Beobachtung. Ganze Zellen, die radioaktiv markiert waren, wie in Abb. 23 beschrieben, wurden nach Entfernung des Kulturmediums mit flüssigem Stickstoff abgekühlt und bei 4°C wieder aufgetaut. Anschließend wurden Mitochondrien isoliert und gelelektrophoretisch untersucht. Abb. 24 zeigt, daß die elektrophoretisch aufgetrennten mitochondrialen Proteine weder nach kurzer noch nach längerer Inkubation der Zellen in Gegenwart von CHI Anzeichen proteolytischen Abbaus aufweisen. Die Erklärung für dieses Phänomen wird in Abb. 22 mitgeliefert. In Abb. 22A sieht man, daß die Mitochondrien-Fraktion aus Stickstoff-vorbehandelten Zellen keine scharfe Proteinbande nach Dichtegradientenzentrifugation bildet. Das offensichtlich von geplatzten Mitochondrien stammende Protein schmiert vom Auftrag des Gradienten bis zum Pellet. Die Bestimmung der Proteinase-Aktivität in den einzelnen Gradienten-Fractionen zeigt, daß beinahe keine Aktivität vorhanden ist.

Abb. 22 (Seite 64)

Verteilung von Protein und Proteinase-Aktivität im Saccharosedichtegradient nach Zentrifugation von Mitochondrien-Präparationen aus unterschiedlich vorbehandelten Zellen. Der Gradient wurde in 10 Fraktionen und Pellet unterteilt.

- O---O : unbehandelte Zellen;
- : Zellen, die 60 min mit CHI vorbehandelt wurden;
- △-'-△ : Zellen, die mit flüssigem Stickstoff tiefgeforen wurden.
- A : Proteinverteilung
- B : Proteinase-Aktivität in Gegenwart von Triton X-100.



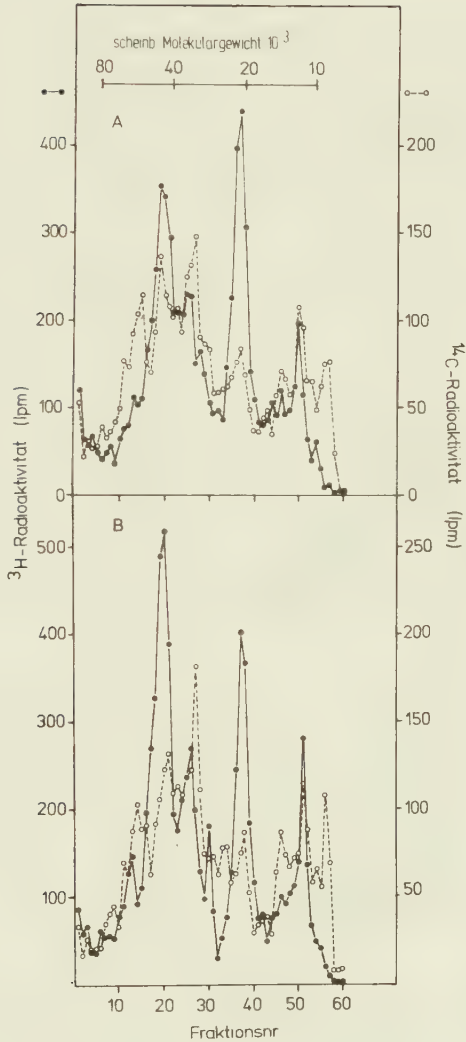


Abb. 23

Gelelektrophoretische Analyse isolierter Mitochondrien nach Reinigung über einen Dichtegradienten. Homogen ^{14}C -markierte Zellen wurden mit ^3H -Leucin für 3 min in Gegenwart von CHI (2,5 min Vorinkubation) spezifisch markiert. Anschließend wurde für 5 min (A) bzw. 60 min (B) ein Leucinase zugegeben.

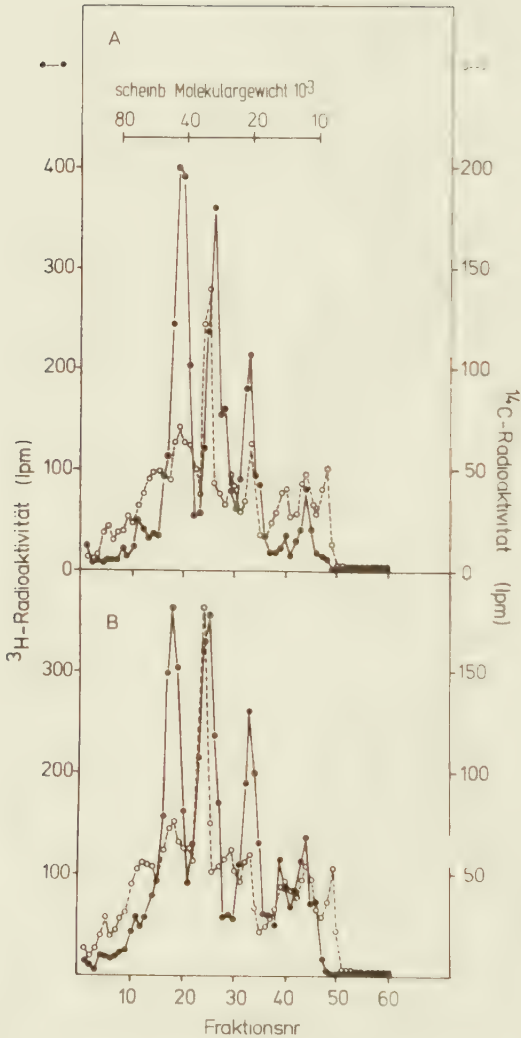


Abb. 24

Gelelektrophoretische Analyse der Mitochondrien-Präparation aus Zellen, die mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden.
Die Zellen waren markiert wie in Abb. 23 beschrieben:
A : 5 min Leucinase; B : 60 min Leucinase.

Im Pellet hat die spezifische Proteinase-Aktivität um etwa 85 - 90 % abgenommen. Dieses Ergebnis bedeutet, daß durch den "freezing-thawing"-Prozeß nicht nur Mitochondrien, sondern auch Proteinase-haltige Vesikel zerstört werden und auslaufen. Die Proteinasen gelangen bei der Isolierung der Mitochondrien in den Isolationsüberstand.

2.2.3. Abhängigkeit der Proteinase-Aktivität in der Mitochondrien-Fraktion von der CHI-Inkubationsdauer der Zellen.

Mitochondrien wurden aus Zellen isoliert, die unterschiedlich lange (bis zu 2 Stunden) mit CHI vorinkubiert waren. Anschließend wurde in den einzelnen Mitochondrien-Präparationen die Proteinase-Aktivität bestimmt. Die Aktivität ist in Abb. 25 in logarithmischem Maßstab gegen die CHI-Inkubationsdauer aufgetragen. Es ist eine lineare Beziehung zu beobachten. Die graphisch ermittelte Halbwertszeit beträgt etwa 22 min.

Hieraus kann folgender Schluß gezogen werden: Die Proteinasen, die durch den angewandten Azocasein-Test erfaßt werden, sind einem Turnover unterworfen. Dies kann Ausdruck eines ständig stattfindenden Auf- und Abbaus sein oder eines ständigen Aufbaus, verbunden mit einer ständigen Abgabe von Proteinasen an das Kulturmedium (50).

2.2.4. Wirkung von Proteinase-Inhibitoren bei der Untersuchung ganzer Zellen.

Aufgrund der Tatsache, daß mitochondriale Translationsprodukte in Gegenwart von CHI spezifisch markiert werden, besteht die Möglichkeit diese zu untersuchen, ohne die Mitochondrien zu isolieren (vgl. Kapitel 2.1.8.). Dazu wurden Zellen in Gegenwart von CHI mit 3-H Leucin markiert, mit flüssigem Stickstoff abgekühlt und gemörsert. Anschließend wurden die Zellproteine

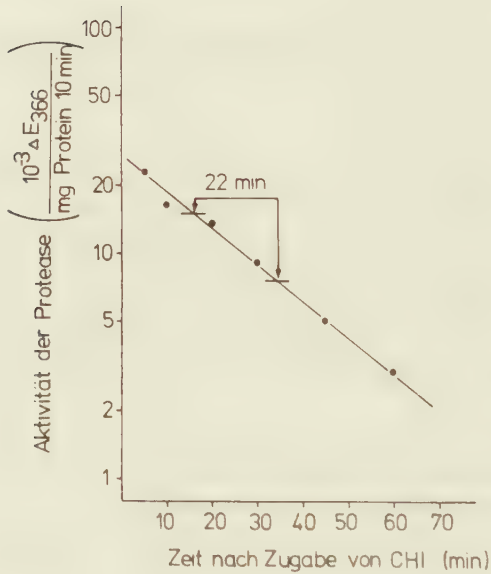


Abb. 25

Abhängigkeit der Proteinase-Aktivität in Mitochondrien-Präparationen von der Dauer der CHI-Inkubation ganzer Zellen. Die spezifische Proteinase-Aktivität ($\Delta E_{366} / \text{mg Protein} \times \text{min}$) wurde in Gegenwart von 1 % Triton X-100 bestimmt.

mit SDS-haltigem Puffer bei 0°C eluiert. Das Ergebnis der gelelektrophoretischen Untersuchung von Zellen, die, wie in Abb. 19 in Gegenwart von CHI spezifisch markiert wurden, ist in Abb. 26 dargestellt. Das Markierungsmuster ist hier nach langer und kurzer CHI-Inkubation praktisch identisch. Obwohl kein Proteinase-Inhibitor zugesetzt wurde, ist unter diesen Versuchsbedingungen kein proteolytischer Abbau mitochondrialer Translationsprodukte feststellbar. Dies zeigt auch der Vergleich mit Abb. 19B, 20B, 23B und 24B. In weiteren Versuchen konnte der gleiche Effekt für cytoplasmatische Translationsprodukte beobachtet werden. Dies bedeutet, daß die Wirkung der vesikulären Proteinase in Gegenwart von SDS offenbar durch intrazelluläre Inhibitoren gehemmt werden kann. Diese Inhibitoren gelangen offenbar während der Isolation der Mitochondrien in den Überstand, so daß die Proteinase in der Mitochondrienfraktion wirksam werden können. Das Vorkommen von Proteinase-Inhibitoren im Cytosol von Neurospora-Zellen ist in der Literatur beschrieben worden (50 - 52).

2.2.5. Möglichkeiten der Hemmung von proteolytischen Enzymen bei der Untersuchung isolierter Mitochondrien.

In diesem Kapitel werden zusammenfassend 4 unterschiedliche Techniken aufgeführt, die den Einfluß von vesikulären Proteinase bei der Untersuchung isolierter Mitochondrien ausschalten können:

A. Zunächst besteht die in Kapitel 2.2.2. beschriebene Möglichkeit, aufgrund des Vorkommens der Proteinase in Vesikeln von hoher Dichte, diese mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von den Mitochondrien zu trennen. Hierbei genügt es, wenn die Mitochondrien-Fraktion über ein 40%iges Saccharose- bzw. Ficoll-Kissen geschichtet und zentrifugiert wird. Die Mitochondrien werden bei diesem Verfahren in einer Grenzschicht zwischen Kissen und Auftragslösung angesammelt. Die Proteinase-Vesikel befinden sich im Pellet. Das vesikuläre Vorkommen der

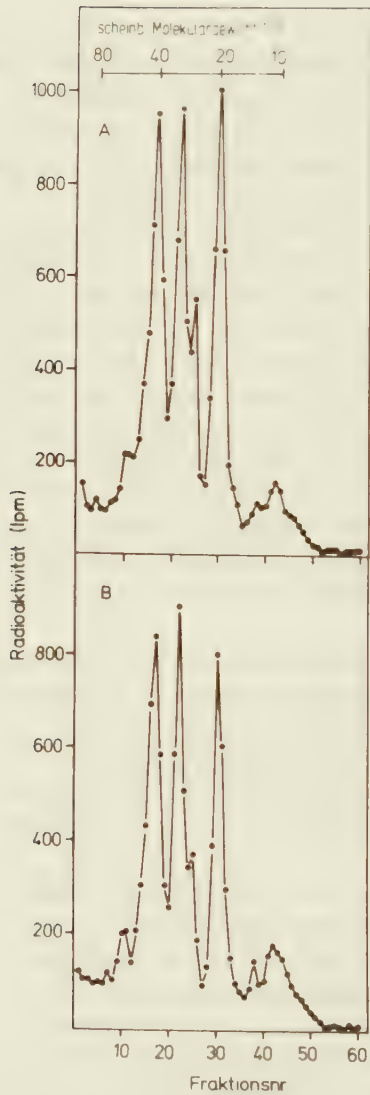


Abb. 26

Gelelektrophoretische Analyse ganzer Zellen, die in Gegenwart von CHI mit 3-H Leucin spezifisch markiert wurden (siehe Abb. 19). A : 5 min Leucinchase; B : 60 min Leucinchase.

Proteinase bedingt auch, daß nach Zerstörung der Vesikel durch Behandlung der Zellen mit Stickstoff in der isolierten Mitochondrien-Fraktion nur mehr geringe Proteinase-Aktivität gemessen wird. Hierbei werden jedoch auch die Mitochondrien zerstört (vgl. Kapitel 2.2.2.). Proteinase-Vesikel können auch zum Auslaufen gebracht werden, wenn diese mit Ultraschall behandelt werden. Dieses Verfahren wendet man bei der Präparation von mitochondrialen Membranen an (vgl. Methoden). Die elektrophoretischen Analysen der mitochondrialen Membranen zeigen wegen der stark herabgesetzten Konzentration der Proteinase durch die große Verdünnung im Ultraschallüberstand, daß nur eine geringe proteolytische Zersetzung der Membranproteine stattfindet.

B. Die zweite grundsätzliche Möglichkeit, störende vesikuläre Proteinase zu beseitigen, ergibt sich aus Kapitel 2.2.3. Dort wurde aufgezeigt, daß mit zunehmender CHI-Inkubationsdauer der Zellen die proteolytische Aktivität der mit den Mitochondrien isolierten Vesikel stark abnimmt. Behandelt man Zellen 60 - 90 min mit CHI, befinden sich in der Mitochondrien-Fraktion praktisch keine vesikulären Proteinase.

C. Als weitere Möglichkeit ist der Einsatz von verschiedenen Inhibitoren getestet worden. Oben wurde beschrieben (Kapitel 2.2.1.), daß durch Verwendung von DFP (Diisopropylfluorophosphat) (1mM) die Proteinase-Aktivität in der Mitochondrien-Fraktion weitgehend gehemmt wird (90 - 95 %). Ähnliche Ergebnisse zeigt auch PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (1mM). 2-Mercaptoäthanol (ME) (10 mM) erweist sich als weniger effektiv (etwa 10 - 20 % Restaktivität). Bei der Anwendung von PMSF ist es nötig, die Proteinase-haltige Mitochondrien-Fraktion etwa 45 - 60 min in Gegenwart des Inhibitors bei 4°C zu inkubieren, um die volle Wirkung zu erzielen. DFP und ME wirken innerhalb 5 - 10 min.

D. Als vierte Methode, vesikuläre Proteinase zu hemmen, hat sich der Einsatz der natürlich in Neurospora-Zellen vorkommenden Inhibitoren bewährt (vgl. Kapitel 2.2.5.). Hierbei zeigte sich, daß bei Verwendung von Zellsaft-Konzentrat die Proteinase-Aktivität in isolierten Mitochondrien stark herabgesetzt wurde.

Die Kenntnis der Wirkung von vesikulären Proteinasen und der richtige Einsatz von Inhibitoren bildeten die Voraussetzungen für die Erstellung eines in vitro Proteinbiosynthese-Systems mit isolierten Mitochondrien (siehe Ergebnis Teil 3). Weiterhin zeigen die Befunde, daß in vivo nach Zugabe von CHI der beobachtete Abbau neu gebildeter mitochondrialer Translationsprodukte nicht durch die unspezifische Wirkung vesikulärer Proteinasen bedingt wird (vgl. Kapitel 2.1.8.).

2.3. Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien.

2.3.0. Problemstellung.

Zur Untersuchung der Leistungen und der Regulation des mitochondrialen Proteinsyntheseapparates eignet sich neben der Ausschaltung der cytoplasmatischen Proteinsynthese in ganzen Zellen durch Cycloheximid auch das Studium der Proteinsynthese isolierter Mitochondrien (Übersichtsartikel: 1 - 4, 53 - 54). Diese Versuchsanordnung erscheint vorteilhaft zur Klärung einer Reihe komplexer Vorgänge, zum Beispiel der Abhängigkeit der mitochondrialen Proteinsynthese von der cytoplasmatischen Proteinsynthese, und der Synthese und Assemblierung von Multienzymeinheiten (Cytochromoxidase, ATPase u.a.) in rekonstituierten Systemen (14 - 20). Bisher war jedoch nicht einwandfrei nachgewiesen, daß isolierte Mitochondrien funktionelle Proteine synthetisieren können (4, 55). Dieser Ergebnisteil beschreibt Experimente, in denen mit Hilfe von Proteinase-Inhibitoren und Zellsaft aus *Neurospora*-Zellen definierte Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese, die unter anderem Untereinheiten der Cytochromoxidase darstellen, hergestellt werden.

2.3.1. Untersuchung der Proteinsynthese isolierter Mitochondrien. Einsatz von Inkubationsmedien mit und ohne Komponenten des Cytoplasmas.

2.3.1.1. Einbau von Leucin in Ab- und Anwesenheit von Zellsaft.

Bei der Synthese mitochondrialer Translationsprodukte in vitro sind gewöhnlich die löslichen Komponenten des Cytoplasmas durch mehrmaliges Waschen der Mitochondrien vorher abgetrennt worden. Um den Einfluß dieser Komponenten zu untersuchen, wurde aus ganzen Zellen, die mit Quarzsand

und Inkubationsmedium bei 0°C aufgeschlossen waren (vgl. Methoden), ein Medium hergestellt, das diese Komponenten teilweise enthielt. Cytoplasmatische Ribosomen und größere Partikel wurden durch Ultrazentrifugation entfernt. Dieses Medium wurde im folgenden Text als Zellsaft bezeichnet.

Der spezifische Einbau von Leucin in isolierte Mitochondrien mit und ohne Zellsaft ist in Abb. 27 dargestellt. Der Einbau wurde anhand des Einbaus von radioaktivem Leucin in TCA-fällbares Protein und der jeweiligen Leucinkonzentration im Inkubationsansatz errechnet. Die Michaeliskonstante (K_m) des Leucineinbaus wurde bestimmt und bei allen Versuchen berücksichtigt (vgl. Methoden). In Gegenwart von Zellsaft wird durchschnittlich 5mal mehr Leucin in TCA-fällbares Protein eingebaut, als in Abwesenheit von Zellsaft. Der Einbau erfolgt mit und ohne Zellsaft für etwa 25 - 30 min mit konstanter Geschwindigkeit. Ohne Zellsaft stoppt der Einbau nach 30 min, mit Zellsaft findet bis zu 60 min noch ein Einbau statt. Bei Zugabe hoher Mengen unmarkierten Leucins wird sichtbar, daß ohne Zellsaft die Menge an Leucin, die in TCA-fällbares Protein integriert war, abnimmt. Mit Zellsaft ist keine Abnahme feststellbar. Das bedeutet, daß ohne Zellsaft der Einbaustopp nach 30 min Ausdruck einer weiterlaufenden Proteinsynthese mit gleichzeitigem Abbau in vitro neu synthetisierter Polypeptide darstellt. Durch CHI (0,1 mg/ml) wird der spezifische Einbau von Leucin nicht beeinflusst. Chloramphenicol (0,5 mg/ml) hingegen hemmt den Einbau etwa um 90 - 93 %.

Diese Daten führen zu dem Schluß, daß der Zellsaft die in vitro Einbauraten von Leucin in isolierte Mitochondrien stimuliert und gleichzeitig den Abbau von in vitro synthetisierten Polypeptiden weitgehend hemmt.

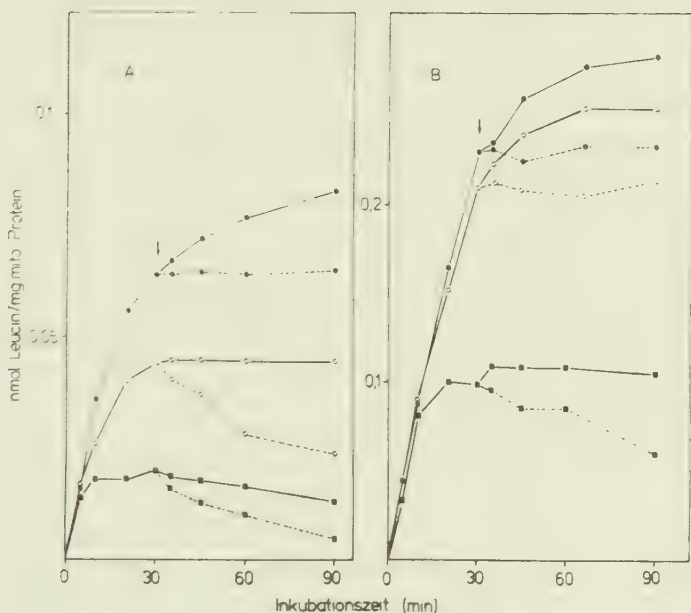


Abb. 27

Kinetik des Einbaus von Leucin in isolierte Mitochondrien unter verschiedenen Bedingungen. Die Menge des eingebauten Leucins wurde anhand des Einbaus von 3-H Leucin in trichlor-essigsäure-fällbares Protein bestimmt.

A : mit Inkubationsmedium;

B : mit Zellsaft;

○—○ : keine weiteren Zusätze;

●—● : mit Inhibitor-Fraktion;

■—■ : mit Inhibitor-Fraktion, Triton X-100 und PMSF (siehe Methoden);

Pfeil : nach 30 min Inkubation wurde zu aliquoten Proben ein Leucinase (5 mM) gegeben (unterbrochene Linien).

2.3.1.2. Einbau von Leucin in isolierte Mitochondrien in Gegenwart eines aus Neurospora-Zellen isolierten Proteinase-Inhibitors.

Um zu prüfen, ob natürlich vorkommende Proteinase-Inhibitoren aus Neurospora-Zellen den Abbau in vitro synthetisierter Polypeptide hemmt, wurde nach einem bekannten Isolierverfahren eine Inhibitor-Rohfraktion hergestellt (56 - 59). Hierzu wurden Zellen zunächst in Wasser auf 65 - 75° C erhitzt und mit Perchlorsäure (Endkonzentration 8 %) versehen. Nach 10 min wurde das Gemenge abgekühlt (15 - 20° C) und mit einer abgemessenen Menge an Kalilauge (5 n) neutralisiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert, und der Überstand mit Ammoniumsulfat behandelt. Die zwischen 25 - 75 % Sättigung fallende Fraktion wurde gesammelt, in Wasser aufgelöst und nach Entfernung des Ammoniumsulfats und der unlöslichen Bestandteile lyophilisiert. Der Proteingehalt des Lyophilisats beträgt etwa 15 - 20 % der Einwaage. Abb. 28 zeigt das Densitogramm der mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennten Polypeptide im Lyophilisat. Die Peptide wurden mit Coomassie-Blue angefärbt. Der größte Teil der Polypeptide besitzt ein scheinbares Molekulargewicht zwischen 6000 - 12000. Dies entspricht dem Molekulargewichtsbereich bekannter Inhibitoren (56 - 59). Das Lyophilisat wurde als Inhibitor-Fraktion bezeichnet.

Abb. 27 zeigt, daß der Einbau von (radioaktivem) Leucin in das TCA-fällbare Protein isolierter Mitochondrien tatsächlich durch die Inhibitor-Fraktion beeinflusst wird. Bei isolierten Mitochondrien, die in Inkubationsmedium mit Inhibitor inkubiert wurden, ist nach 60 min noch ein Einbau festzustellen. Während der untersuchten Zeitperiode wird etwa um den Faktor 1.8 - 1.9 mehr Leucin eingebaut als ohne Inhibitor. In Gegenwart von Zellsaft hat die Inhibitor-Fraktion keine stimulierende Wirkung. Nach Zugabe eines Leucinase (5 mM) findet in Gegenwart vom Inhibitor keine Abnahme von in vitro eingebautem Leucin statt.

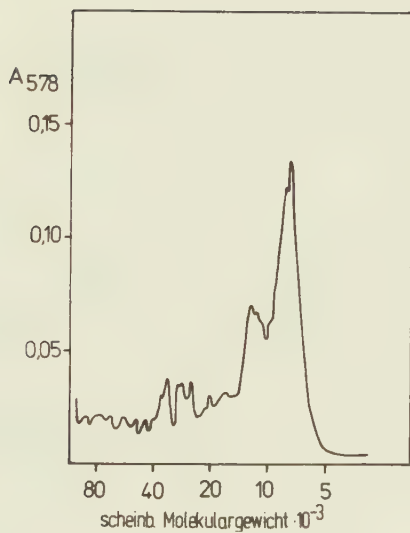


Abb. 28

Gelelektrophoretische Analyse der Proteinase-Inhibitor-Fraktion aus Neurospora-Zellen. Das Gel wurde mit Coomassie-Blue angefärbt und bei 578 nm densitometriert.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Inhibitor-Fraktion offenbar ähnliche Wirkungen ausübt wie der Zellsaft. Sie stimuliert die mitochondriale Proteinsynthese und verhindert, daß in vitro synthetisierte Polypeptide abgebaut werden. Aus der Beobachtung, daß die anfängliche Syntheserate ohne und mit Inhibitor-Fraktion nahezu gleich ist, läßt sich ableiten, daß die Stimulierung eine Folge der Hemmung des Abbaus ist.

2.3.1.3. Einbau von Leucin in isolierte Mitochondrien nach Lyse der mitochondrialen Membran mit Triton X-100.

Die Kenntnis, daß vesikuläre Proteinasen in Mitochondrienpräparationen durch den Einsatz von Inhibitoren ausgeschaltet werden können (vgl. Kapitel 2.2.5. und 3.1.2.), veranlaßte Untersuchungen, ob mitochondriale Ribosomen nach Lyse der mitochondrialen Membran (und der Proteinase-Vesikel) noch TCA-fällbare Polypeptide synthetisieren können. Isolierte Mitochondrien wurden hierzu nach Zugabe der Inhibitor-Fraktion mit Inkubationspuffer bzw. Zellsaft zunächst bei 0°C mit PMSF (2 mM) 45 min vorinkubiert. Danach wurden die Proben auf 25°C gebracht und der Einbau von Leucin wurde bestimmt.

In Abb. 27 sieht man, daß etwa 10 min lang der Einbau von Leucin mit konstanter Geschwindigkeit erfolgt. Die Syntheserate ist während dieser Zeit gleich groß wie in Abwesenheit von Triton X-100. Ein Leucin-chase nach 30 min Inkubation macht klar, daß auch nach 60 min eine Neusynthese von Polypeptiden stattfindet. Der Neusynthese steht ein etwa gleich großer Abbau neusynthetisierter Produkte gegenüber. Im Vergleich zu Proben ohne Triton X-100 wurden in Gegenwart von Triton X-100 innerhalb des untersuchten Zeitraums nur 16 % (mit Inkubationspuffer) bzw. 37 % (mit Zellsaft) der Leucinmenge in TCA-fällbare Polypeptide integriert.

Das bedeutet, daß mitochondriale Ribosomen in einem Membran-freien System Polypeptide herstellen können, wenn auch ihre Aktivität relativ schnell abnimmt. Welche Polypeptide hergestellt werden, und ob sich darunter definierte Bestandteile mitochondrialer Enzyme befinden, wird im nächsten Kapitel behandelt (Kapitel 2.3.2.).

2.3.2. Produkte der Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien.

2.3.2.1. Gelelektrophoretische Untersuchung der synthetisierten Polypeptide.

Um festzustellen, welche Polypeptide in isolierten Mitochondrien erzeugt werden, wurden isolierte Mitochondrien 90 min lang mit 3-H Leucin inkubiert. Die Mitochondrien waren zuvor mit 14-C Leucin in vivo homogen markiert worden. Abb. 29 zeigt die Verteilung der Radioaktivität über die Gele bei Proben, die mit und ohne Zellsaft sowie in Gegenwart und in Abwesenheit der Inhibitor-Fraktion inkubiert worden waren (vgl. Abb. 27). Zunächst ist zu beobachten, daß die homogene Markierung der Mitochondrienproteine in allen Proben praktisch das gleiche gelelektrophoretische Muster ergibt. Es sind keine Anzeichen eines proteolytischen Abbaus von in vivo gebildeten Mitochondrienproteinen zu erkennen. Offensichtlich werden die im vorigen Ergebnisteil (Teil 2) beschriebenen Proteinasen unter diesen Bedingungen nicht aktiv. Die verschiedenen Proben zeigen jedoch erhebliche Unterschiede hinsichtlich des in vitro eingebauten radioaktiven Leucins.

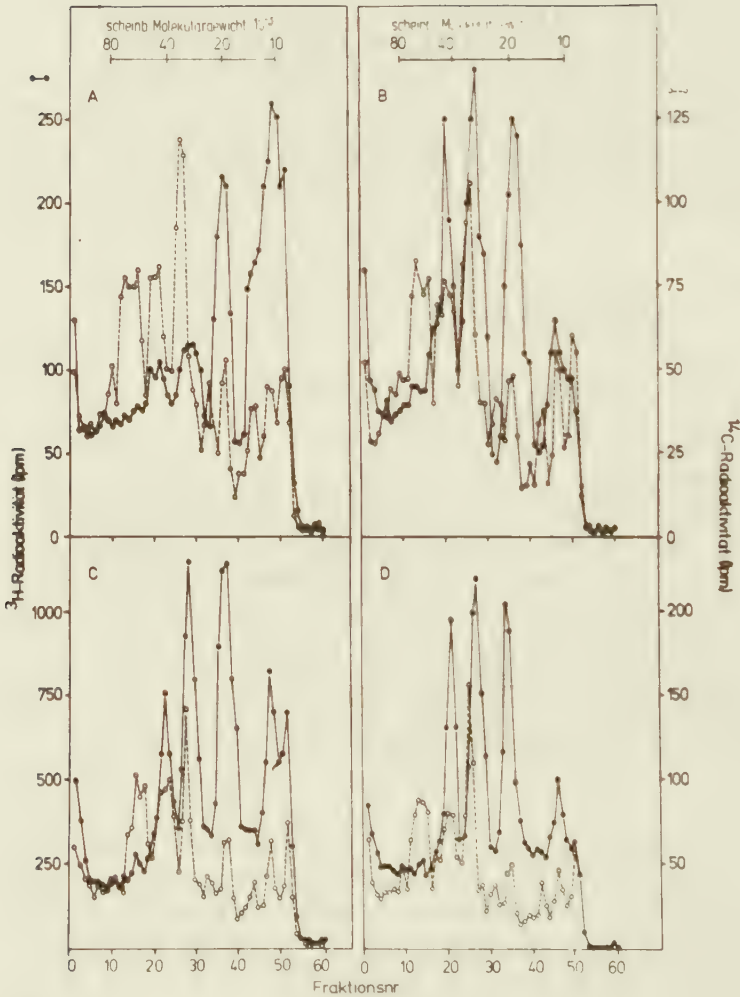


Abb. 29

SDS-gelelektrophoretische Analyse der in isolierten Mitochondrien synthetisierten Polypeptide. Die isolierten Mitochondrien wurden 90 min mit ³-H Leucin inkubiert (vgl. auch Abb. 27).

A, B : mit Inkubationsmedium;

C, D : mit Zellsaft;

A, C : ohne weiteren Zusatz;

B, D : mit Proteinase-Inhibitor-Fraktion;

●—● : *in vitro*-Markierung (³-H Leucin);

○---○ : homogene *in vivo*-Markierung der Mitochondrienproteine (¹⁴-C Leucin).

Wurde den isolierten Mitochondrien weder Zellsaft noch Inhibitor-Fraktion zugesetzt, so findet sich die in vitro eingebaute Radioaktivität hauptsächlich in Banden mit niedrigen scheinbaren Molekulargewichten (8000 - 14000 und 20000) (vgl. Abb. 29A). Nach Einsatz der Inhibitor-Fraktion befindet sich der Großteil der Radioaktivität in Banden, die Polypeptide mit scheinbaren Molekulargewichten von etwa 42000, 27000 - 32000 und 20000 repräsentieren (Abb. 29B). Nur wenig Radioaktivität ist in diesem Fall in niedermolekularen Banden. In Übereinstimmung mit den Leucineinkbau-Untersuchungen (vgl. Kapitel 2.3.1.2.) besagt dieses Ergebnis, daß die Inhibitor-Fraktion den Abbau von in vitro gebildeten Polypeptiden hemmt.

Auch nach dem Einsatz von Zellsaft (Abb. 29C) werden hauptsächlich Produkte mit höheren scheinbaren Molekulargewichten hergestellt. Wird neben dem Zellsaft noch die Inhibitor-Fraktion zugesetzt, so finden sich im niedrigen Molekulargewichtsbereich noch weniger markierte Produkte (Abb. 29D). Dies bedeutet, daß der Zellsaft alleine den Abbau von in vitro gebildeten Polypeptiden schon weitgehend hemmt. Diese Hemmung kann durch Zusatz der Inhibitor-Fraktion verbessert werden.

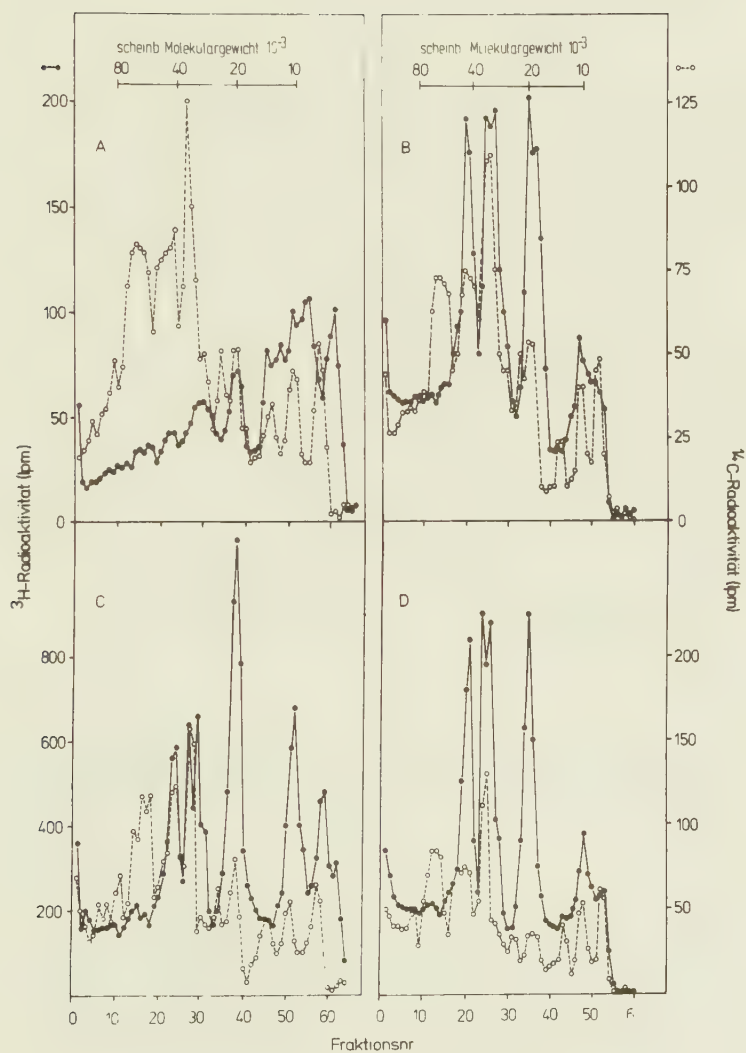
Die in vitro Markierungsmuster in Abb. 29B, C und D sind sehr ähnlich dem Markierungsmuster, das erhalten wird, wenn Mitochondrien in vivo in Gegenwart von CHI markiert werden (vgl. Abb. 19, 20, 23, 24). Dies trifft zu, obwohl das in vitro-System nur 1 - 3 % der Translationsleistung der Mitochondrien in vivo aufweist. Die Verhältnisse der einzelnen Radioaktivitätsbanden zueinander sind in vitro anders als in vivo und hängen von den Inkubationsbedingungen ab. Höhermolekulare Polypeptide (25000 - 50000) haben in vitro meistens einen geringeren Anteil an der Gesamtradioaktivität.

Abb. 30 zeigt die gelelektrophoretische Analyse derjenigen Mitochondrien, die nach 30 min Inkubation mit 3-H Leucin mit einem Leucinchase (60 min lang) versehen wurden (vgl. Abb. 27). Die gelelektrophoretischen Muster derjenigen Mitochondrien, die in Gegenwart der Inhibitor-Fraktion inkubiert wurden, zeigen gegenüber den entsprechenden Proben in Abb. 29 keine wesentliche Veränderung (Abb. 30B und D). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Abb. 27. In beiden Fällen verringert sich die Menge des eingebauten Leucins nach Chase nicht. Die Probe, die in Gegenwart von Zellsaft allein inkubiert wurde, zeigt zwar auch keine Abnahme des eingebauten Leucins nach 60 min Chase (vgl. Abb. 27). Das gelelektrophoretische Muster in Abb. 30C zeigt jedoch, daß nach Leucinchase vergleichsweise (vgl. Abb. 29C) weniger Radioaktivität in die Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 30000 eingebaut ist. Es wurde in verschiedenen Experimenten beobachtet, daß der relative Anteil dieser Bande unterschiedlich hoch sein kann. Die Ursache für diese Schwankungen ist unklar.

Abb. 30A zeigt das Markierungsmuster von Mitochondrien, die ohne Zusätze in vitro Puls-Chase-markiert wurden. Wie in Abb. 29A ist die 3-H-Markierung in Polypeptiden mit höheren scheinbaren Molekulargewichten gering. Ein beträchtlicher Anteil befindet sich in Polypeptiden mit niedrigen Molekulargewichten. Zuzüglich tritt eine neue Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 7000 auf. Die Gesamtradioaktivität der Puls-Chase-markierten Probe in Abb. 30A ist wesentlich geringer als in der ohne Chase markierten Probe. Dies stimmt auch mit dem Ergebnis in Abb. 27 überein.

Abb. 30 (Seite 83)

SDS-gelelektrophoretische Analyse der in isolierten Mitochondrien synthetisierten Polypeptide. Die isolierten Mitochondrien wurden 30 min in Gegenwart von 3-H Leucin inkubiert und anschließend weitere 60 min mit unmarkiertem Leucin (vgl. in Abb. 27). Bezeichnungen wie in Abb. 29.



Die homogenen Markierungsmuster in den einzelnen Proben der Abb. 30 unterscheiden sich nicht und zeigen, wie für Abb. 29 dargestellt, keine Zeichen von proteolytischem Abbau.

In den in Abb. 29 und 30 beschriebenen Experimenten wurde so verfahren, daß den gesamten Inkubationsansätzen SDS zur Lyse zugesetzt wurde, und dann das nicht eingebaute 3-H Leucin durch Dialyse gegen SDS-haltigem Puffer entfernt wurde. In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden die Mitochondrien zuerst aus dem Inkubationsabsatz herauszentrifugiert und gewaschen. Dann wurden die Mitochondrien mit SDS lysiert, dialysiert und der Gelelektrophorese unterworfen. Im Fall derjenigen Mitochondrien, die allein im Inkubationsmedium inkubiert wurden, finden sich 20 - 30 % der nicht-dialysierbaren 3-H Radioaktivität im postmitochondrialen Überstand. Homogene Grundmarkierung wurde in diesem Überstand kaum gefunden. Wenn Mitochondrien mit der Inhibitor-Fraktion oder/und Zellsaft inkubiert wurden, fand sich weder 3-H noch 14-C Radioaktivität in signifikantem Ausmaß im postmitochondrialen Überstand (siehe Tabelle 4, Seite 85).

Die gelelektrophoretische Analyse der Polypeptide im postmitochondrialen Überstand ergab, daß die Produkte ausschließlich scheinbare Molekulargewichte von weniger als 12000 besitzen.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen folgendes: Isolierte Mitochondrien synthetisieren in vitro weitgehend die gleichen Polypeptide, die in ganzen Zellen in Gegenwart von CHI gebildet werden. Dies ist allerdings von der Anwesenheit einer aus ganzen Zellen isolierbaren Proteinase-Inhibitor-Fraktion abhängig. In Abwesenheit dieses Inhibitors werden spezifisch in vitro synthetisierte Polypeptide abgebaut. Die Abbauprodukte der in vitro gebildeten Polypeptide

Tabelle 4:

Abgabe von in isolierten Mitochondrien synthetisierten Polypeptiden in den postmitochondrialen Überstand. Abhängigkeit der Abgabe von den in vitro Inkubationsbedingungen. Die Mitochondrien waren markiert wie in Abb. 29 und 30 beschrieben.

Mitochondrien inkubiert in	Radioaktivität im postmitochondrialen Überstand	
	(% der nicht-dialysierbaren Radioaktivität in den Proben)	
	3-H (<u>in vitro</u> Markierung)	14-C (<u>in vivo</u> Markierung)
Inkubationsmedium	20 - 30	2 - 5
Inkubationsmedium und Inhibitor- Fraktion	3 - 5	2 - 5
Zellsaft	3 - 4	2 - 4
Zellsaft und Inhibi- tor-Fraktion	2 - 3	2 - 3

verlassen teilweise das Mitochondrium und sind im post-mitochondrialen Überstand nachweisbar.

Die in isolierten Mitochondrien synthetisierten Polypeptide werden zum überwiegenden Teil fest in die mitochondriale Membran integriert. Dies beweisen Experimente, in denen mitochondriale Membranen isoliert und analysiert wurden: Bei der Präparation von Membranen aus isolierten Mitochondrien wird kein eingebautes Leucin verloren. Die gelelektrophoretischen Markierungsmuster der Membranen unterscheiden sich nicht von denjenigen der Mitochondrien.

2.3.2.2. Immunopräzipitierbare Komponenten der Cytochromoxidase.

Die Frage, ob isolierte Mitochondrien definierte Polypeptide herstellen, wurde anhand der mitochondrial gebildeten Untereinheiten der Cytochromoxidase untersucht (vgl. Kapitel 2.1.8.2.). Dazu wurde ein Antikörper gegen gesamte Cytochromoxidase eingesetzt. Der Antikörper präzipitiert etwa 2 - 3 % der homogenen Markierung isolierter Mitochondrien. Wenn Mitochondrien in vitro mit 3-H Leucin inkubiert wurden, ist die präzipitierbare Menge an 3-H Radioaktivität davon abhängig, ob mit oder ohne Zellsaft inkubiert wurde. Nach Inkubation mit Zellsaft werden 12 - 15 % der in vitro eingebauten Radioaktivität gefällt. Ohne Zellsaft werden nur etwa 4 - 6 % präzipitiert. In beiden Fällen bewirkt der Zusatz der Inhibitor-Fraktion keine Änderung des fällbaren Anteils.

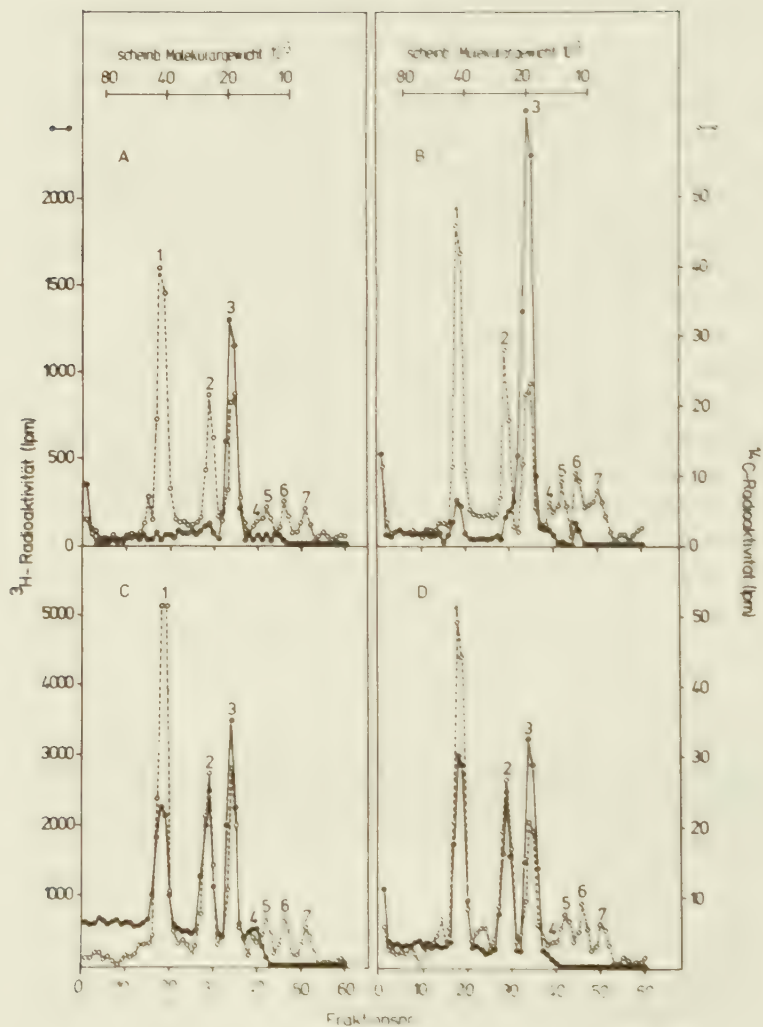
Abb. 31 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Immunopräzipitate. Mit dem Antikörper können nach Inkubation der Mitochondrien alle 7 Untereinheiten der Cytochromoxidase gefällt werden. Dies erkennt man an dem Auftreten der 7 Radio-

aktivitätsmaxima im Fall der homogenen Markierung. Werden isolierte Mitochondrien in Abwesenheit von Zellsaft mit 3-H Leucin markiert, so wird mit Antiserum gegen die gesamte Cytochromoxidase fast ausschließlich die Untereinheit 3 gefällt (Abb. 31A). Die Anwesenheit der Inhibitor-Fraktion bewirkt keine Veränderung dieses Musters (Abb. 31B). Nach Inkubation der Mitochondrien in Gegenwart von Zellsaft treten hingegen drei prominente Radioaktivitätsmaxima auf (Abb. 31C und D). Diese stellen die drei Untereinheiten der Cytochromoxidase dar, die an den mitochondrialen Ribosomen gemacht werden (Untereinheiten 1, 2 und 3). Die relativen Mengen an Radioaktivität in den einzelnen Maxima sind denjenigen ähnlich, die beobachtet werden, wenn intakte Zellen in Gegenwart von CHI markiert werden (vgl. Kapitel 2.1.8., Abb. 17). Das Auftreten eines kleinen Maximums mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 15000 stellt eine Verunreinigung dar, die häufig in Immunopräzipitaten nach in vitro Markierung zu sehen ist. Diese Ergebnisse werden nicht verändert, wenn nach 30 min in vitro Markierung ein Leucin Chase für 60 min zugegeben wird.

Abb. 31 (Seite 88)

Gelelektrophoretische Analyse der immunopräzipitierten Cytochromoxidase aus Mitochondrien nach in vitro Einbau von 3-H Leucin. Mitochondrien aus Zellen, die homogen mit 14-C Leucin markiert waren, wurden 90 min mit 3-H Leucin inkubiert (siehe auch Abb. 27).

- A, B : mit Inkubationsmedium;
- C, D : mit Zellsaft;
- A, C : ohne weitere Zusätze;
- B, D : mit Inhibitor-Fraktion;
- : in vitro Markierung (3-H);
- o---o : homogene Markierung in vivo (14-C);
- 1 - 7 : Untereinheiten der Cytochromoxidase.



Folgende Schlüsse können aus diesen Beobachtungen gezogen werden:

1. Isolierte Mitochondrien besitzen die Fähigkeit, definierte Polypeptide zu bilden, wie hier am Beispiel der Untereinheiten der Cytochromoxidase gezeigt wird.
2. Diese Fähigkeit haben Mitochondrien, die in Inkubationspuffer gehalten werden, nur in einem begrenzten Ausmaß. Es kann nach Inkubation mit 3-H Leucin aus solchen Mitochondrien eine Cytochromoxidase präzipitiert werden, in der lediglich die Untereinheit 3 markiert ist.
3. Der Zusatz der Inhibitor-Fraktion vor der Inkubation führt zwar zur Ausbildung eines Markierungsmusters der Mitochondrien, das demjenigen von Mitochondrien gleicht, die in vivo in Gegenwart von CHI markiert wurden. Wiederum ist jedoch nur die Untereinheit 3 im Immunopräzipitat markiert. Dies deutet darauf hin, daß die Untereinheiten der Cytochromoxidase gebildet werden, jedoch nicht zu einem immunopräzipitierbaren Komplex assembliert werden. Das heißt, daß mit Hilfe von Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase die Synthese von einzelnen Untereinheiten nicht erfaßt werden kann.
In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß nicht-assemblierte Untereinheit 3 nicht mit dem verwendeten Antikörper reagiert (vgl. auch Kapitel 2.1.8.2.).
4. Da sich beim Zusatz von Zellsaft nicht das Markierungsmuster der Mitochondrien ändert (vgl. Kapitel 3.2.1.), wohl aber dasjenige der immunopräzipitierten Cytochromoxidase, muß angenommen werden, daß im Zellsaft Komponenten vorhanden sind, die die Integration der Untereinheiten 1 und 2 in einem immunopräzipitierbaren Komplex ermöglichen, das heißt eine zumindest partielle Assemblierung der Cytochromoxidase bewirken.

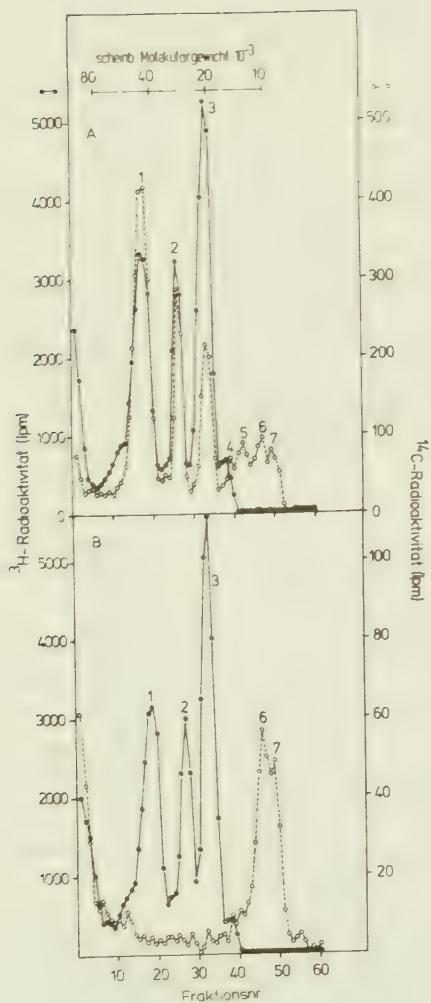
Zur weiteren Untersuchung der Komponenten im Zellsaft, die die Assemblierung der Cytochromoxidase ermöglichen, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Zellen wurden 10 min mit $^{14}\text{-C}$ Leucin pulsmarkiert und daraus Zellsaft hergestellt. Die Markierungszeit wurde deshalb so kurz gewählt, damit im Cytosol vorhandene Komponenten, die für die Assemblierung der Cytochromoxidase notwendig sind bzw. dabei verbraucht werden, noch radioaktiv markiert vorhanden sind. Diese Überlegung wurde aufgrund der Befunde von SCHWAB et al. (34, 43) angestellt, in denen auf der Basis kinetischer Untersuchungen die Existenz von Vorstufenpools der Untereinheiten der Cytochromoxidase postuliert wurde. Isolierte Mitochondrien wurden in Gegenwart dieses so markierten Zellsafts mit 3-H Leucin inkubiert. Dann wurde die Cytochromoxidase mit Antikörper gefällt. Ca. 0,4 % der mit dem Zellsaft eingesetzten $^{14}\text{-C}$ Radioaktivität und ca. 13 % der in vitro inkorporierten Radioaktivität wurden gefällt. Zur Kontrolle wurde ein Experiment mit nicht-markiertem Zellsaft ausgeführt (siehe auch oben).

Abb. 32 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Immunopräzipitate. Im Experiment (Abb. 32B) und in der Kontrolle (Abb. 32A) sind drei prominente Radioaktivitätsmaxima zu erkennen, die auf der Basis der Doppelmarkierung in der Kontrolle die Untereinheiten 1 - 3 der Cytochromoxidase darstellen. In dem Immunopräzipitat aus Mitochondrien, die mit $^{14}\text{-C}$ Zellsaft inkubiert wurden, treten zwei $^{14}\text{-C}$ Radioaktivitätsmaxima auf. Ihre elektrophoretische Beweglichkeit bzw. ihr scheinbares Molekulargewicht entspricht denen

Abb. 32 (Seite 91)

Gelelektrophoretische Analyse von immunopräzipitierter Cytochromoxidase aus Mitochondrien, die in vitro in Gegenwart von radioaktivem Leucin und von Zellsaft inkubiert wurden. (1 - 7: Untereinheiten der Cytochromoxidase).

- A: Mitochondrien aus in vivo mit $^{14}\text{-C}$ Leucin homogen markierten Zellen wurden mit 3-H Leucin und mit Zellsaft inkubiert.
- B: Mitochondrien unmarkierter Zellen wurden mit 3-H Leucin und Zellsaft aus Zellen inkubiert, die 10 min mit $^{14}\text{-C}$ Leucin homogen markiert waren.



von Untereinheiten 6 und 7. Wie bereits dargestellt, werden diese an den cytoplasmatischen Ribosomen gebildet (siehe Kapitel 2.1.8.). In einem weiteren Kontrollexperiment wurde sichergestellt, daß ohne Durchführung der 90minütigen Inkubation der Mitochondrien keine entsprechenden $^{14}\text{-C}$ markierten Komponenten mit dem Antikörper gefällt werden.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die Komponenten im Zellsaft, die die Integration von Untereinheit 1 und 2 in einen immunopräzipitierbaren Komplex bewirken, cytoplasmatisch synthetisierte Untereinheiten der Cytochromoxidase darstellen können. Im Fall, daß diese Erklärung richtig ist, sollte es möglich sein, das Ausbleiben dieser partiellen Assemblierung dadurch zu bewirken, daß ein Zellsaft eingesetzt wird, in dem die Vorstufenpools der cytoplasmatischen Untereinheiten erschöpft sind. Diese Problematik wird in Kapitel 2.3.4. aufgegriffen.

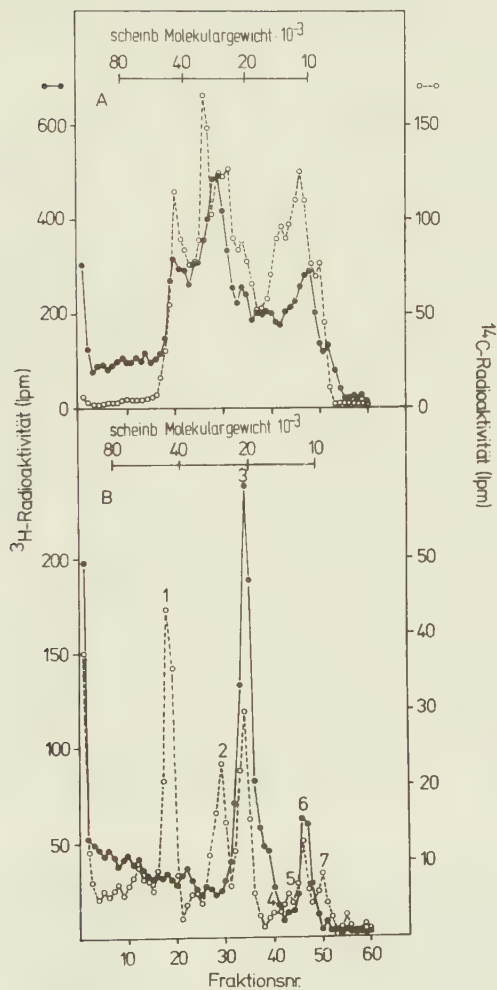
2.3.2.3. Produkte der Proteinsynthese von detergensolubilisierten Mitochondrien.

Wie dargestellt (siehe Kapitel 3.1.3.), können mitochondriale Ribosomen auch nach Lyse der mitochondrialen Membran mit Triton X-100 TCA-fällbare Polypeptide synthetisieren. Abb. 33 zeigt die SDS-gelelektrophoretische Auftrennung dieser Polypeptide. Homogen markierte Mitochondrien wurden mit PMSF, Zellsaft und Inhibitor-Fraktion vorbehandelt. Nach Lyse der mitochondrialen Membranen

Abb. 33 (Seite 93)

Gelelektrophoretische Analyse der von detergensolubilisierten Mitochondrien synthetisierten Polypeptide. Homogen $^{14}\text{-C}$ markierte Mitochondrien wurden mit PMSF und Triton X-100 versehen und 90 min in Gegenwart von 3-H Leucin inkubiert (vgl. Abb. 27).

- A : Gesamte Mitochondrien;
- B : immunopräzipitierte Cytochromoxidase;
- 1 - 7 : Untereinheiten der Cytochromoxidase.



wurde 90 min bei 25° C inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde anschließend bei 0° C dialysiert und gelelektrophoretisch untersucht (Abb. 33A). Ein zweiter Teil wurde mit Antikörper gegen Cytochromoxidase behandelt. Die gelelektrophoretische Analyse des Immunopräzipitats ist in Abb. 33B gezeigt.

Abb. 33A demonstriert zunächst, daß sowohl das 14-C- als auch das 3-H-Markierungsmuster anders ist als dasjenige von nicht-lysierten Mitochondrien. Dies zeigt der Vergleich mit Abb. 29D. Die Vorinkubation der Mitochondrien mit PMSF ändert die in Abb. 29D gezeigten Markierungsmuster nicht. In Abb. 33A fehlt beim homogenen Markierungsmuster der Radioaktivitätsgipfel im scheinbaren Molekulargewichtsbereich zwischen 70000 - 80000. Dafür erscheint relativ mehr Radioaktivität im Molekulargewichtsbereich zwischen 20000 - 30000 und 8000 - 15000. Das bedeutet, daß während der Inkubation mit Triton trotz des Einsatzes von Inhibitoren ein Teil der mitochondrialen Proteine von proteolytischen Enzymen angegriffen wurden (vgl. Ergebnisteil 2). Dieser Umstand wird auch bei der Untersuchung der in vitro markierten Translationsprodukte sichtbar. Die Verteilung der 3-H Radioaktivität über das Gel ist diffus. Die Radioaktivitätsmengen in den drei Maxima mit scheinbaren Molekulargewichten von 41000, 30000 und 20000 unterscheiden sich erheblich von denjenigen, die in Abwesenheit von Triton beobachtet werden (Abb. 29D). Relativ viel Radioaktivität findet sich in niedermolekularen Produkten (9000 - 14000).

Die gelelektrophoretische Untersuchung des Immunopräzipitats (Abb. 33B) zeigt, daß noch alle Untereinheiten der Cytochromoxidase mit Antikörper gefällt werden. Die relativen Intensitäten der 14-C Radioaktivitätsbanden sind jedoch im Vergleich zu nicht-lysierten Proben verändert (vgl. Abb. 31). Die Untereinheiten 3 und 6 sind stärker vertreten.

Das in vitro Markierungsmuster weist zwei Radioaktivitätsgipfel auf. Der Hauptgipfel fällt mit der Untereinheit 3 der Cytochromoxidase zusammen. Der zweite Gipfel hat ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 10000 - 12000. Er stellt vermutlich ein proteolytisches Abbauprodukt eines an mitochondrialen Ribosomen synthetisierten Polypeptids dar, welches entweder selbst mit dem Antikörper reagiert oder unspezifisch mit Cytochromoxidase assoziiert ist.

Diese Ergebnisse erlauben folgende Schlüsse:

Mitochondriale Ribosomen können nach Lyse der mitochondrialen Membran mit Triton Polypeptide mit scheinbaren Molekulargewichten zwischen 9000 - 45000 herstellen. Manche dieser Polypeptide besitzen die gleichen scheinbaren Molekulargewichte wie Produkte, die in Gegenwart von CHI in intakten Zellen von den mitochondrialen Ribosomen gemacht werden. Mit Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase kann gezeigt werden, daß in diesem in vitro-System ein Produkt hergestellt wird, das die gleiche gelelektrophoretische Beweglichkeit besitzt wie die Untereinheit 3 dieses Enzyms. Da der verwendete Antikörper nicht mit der isolierten Untereinheit 3 der Cytochromoxidase reagiert (siehe oben), kann auf der Grundlage der vorliegenden Information nicht entschieden werden, ob diese Reaktion entweder eine Teilassemblierung darstellt oder eine spezifische Assoziation mit intakter Cytochromoxidase oder ein Austausch von Untereinheit 3 in intakter Cytochromoxidase (vgl. Kapitel 2.1.8.2.).

2.3.3. Untersuchung der Proteinsyntheseleistung isolierter Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen.

2.3.3.1. Einbau von radioaktivem Leucin in Abwesenheit von Zellsaft.

Um den Einfluß der Vorinkubation von Zellen mit CHI auf die Fähigkeit isolierter Mitochondrien zur Proteinsynthese zu un-

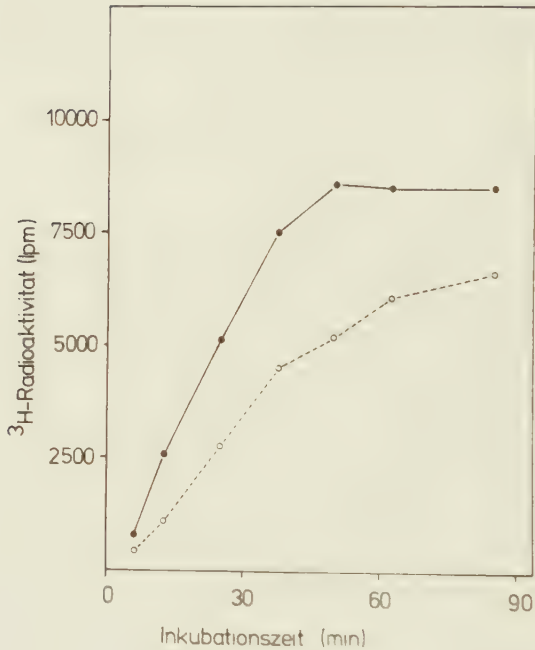


Abb. 34

Einbau von $^3\text{-H}$ Leucin in isolierte Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen. Die Mitochondrien wurden im Inkubationsmedium resuspendiert und bei 25°C inkubiert.

●—● : Kontrolle: Mitochondrien aus unbehandelten Zellen;

○---○ : Mitochondrien aus Zellen, die 100 min mit CHI vorinkubiert waren.

tersuchen, wurden Mitochondrien aus Zellen isoliert, die etwa eine halbe Verdopplungsperiode (100 min) mit CHI vorbehandelt waren. Es darf angenommen werden, daß diese Behandlung zu einem weitgehenden Verbrauch derjenigen Polypeptide führt, die an den cytoplasmatischen Ribosomen gebildet werden und zusammen mit mitochondrial gebildeten Polypeptiden in die Mitochondrienmembran integriert werden. Als Kontrolle wurden Mitochondrien aus unbehandelten Zellen isoliert. Die isolierten Mitochondrien wurden in Inkubationspuffer mit radioaktivem Leucin inkubiert. Der Einbau in TCA-fällbares Protein ist in Abb. 34 gezeigt:

Mitochondrien aus Zellen, die 100 min mit CHI vorbehandelt waren, inkorporieren etwa 20 - 30 % weniger Leucin als Kontroll-Mitochondrien. In der Kontrolle stoppt der Einbau nach 30 - 40 min (vgl. auch Abb. 27). Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen bauen auch nach 60 min Inkubation noch radioaktives Leucin ein. Nach Zugabe eines Leucinchase ist die Abnahme an TCA-fällbare Radioaktivität etwa 10 - 15 % langsamer als in der Kontrolle (vgl. Abb. 27). Dieses Ergebnis zeigt, daß Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen Polypeptide synthetisieren, wenn auch mit etwas geringerer Geschwindigkeit als Mitochondrien aus unbehandelten Zellen. Dies stimmt mit den Beobachtungen in intakten Zellen in Gegenwart von CHI überein (vgl. Ergebnisteil 2.1., Abb. 16).

2.3.3.2. Einbau von radioaktivem Leucin in Gegenwart von Zellsaft aus CHI-vergifteten Zellen.

Zellsaft wurde aus Zellen hergestellt, die, wie oben beschrieben (siehe Kapitel 2.3.3.1.), 100 min mit CHI vorbehandelt waren. Dieser Zellsaft wurde in vitro-Experimenten mit Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten und unbehandelten Zellen eingesetzt. Als Kontrolle diente Zellsaft aus unvergifteten Zellen.

In Abb. 35 sieht man, daß der Einsatz von 'CHI-Zellsaft' den Einbau von radioaktivem Leucin in Mitochondrien-Protein um etwa 60 - 70 % herabsetzt. Wenn man jedoch die Leucinkonzentration im Zellsaft berücksichtigt (vgl. Leucinpools der Zellen in Gegenwart von CHI: Abb. 2), wird sichtbar, daß die tatsächliche Proteinsyntheserate in allen Fällen beinahe gleich groß ist. Die Kontrolle (Mitochondrien und Zellsaft aus unbehandelten Zellen) zeigt eine abweichende Einbaukinetik. Die Geschwindigkeit des Einbaus ist hier zunächst relativ hoch, nimmt aber nach 40 min stärker ab als im Fall der anderen Proben. Nach 90 min Inkubation sind in den Proben, in denen entweder Mitochondrien oder Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen verwendet worden waren, durchschnittlich 15 - 20 % weniger Leucin eingebaut als in der Kontrolle. Bei Zugabe eines Leucin-chases kann in keinem Fall eine Abnahme an inkorporierter Radioaktivität festgestellt werden.

Diese Befunde bestätigen zunächst die im letzten Kapitel gemachten Beobachtungen: die Proteinsynthese von Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen ist gegenüber derjenigen von Mitochondrien aus unbehandelten Zellen etwas verlangsamt. Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen beeinflusst die Proteinsynthese von Mitochondrien aus unbehandelten Zellen auf ähnliche Weise. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die CHI-Behandlung von Zellen die Syntheseleistung von isolierten Mitochondrien bzw. die stimulierende Wirkung von Zellsaft nur geringfügig beeinflusst. Eine Analyse der in vitro hergestellten Produkte findet sich im folgenden Kapitel.

2.3.4. Produkte der Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen.

2.3.4.1. Polypeptide, die in Abwesenheit von Zellsaft synthetisiert werden.

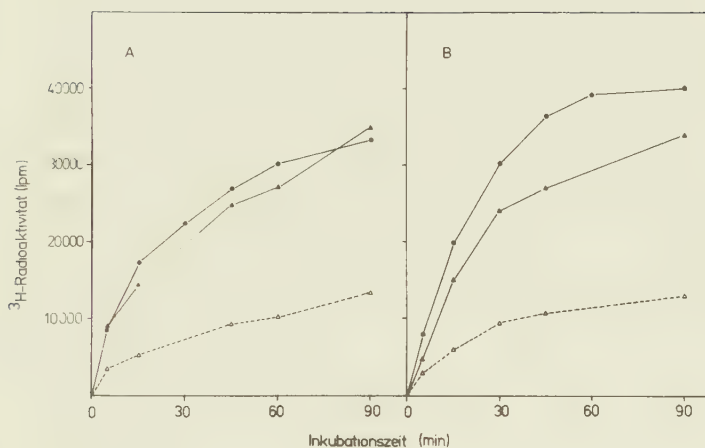


Abb. 35

Einbau von 3-H Leucin in isolierte Mitochondrien in Gegenwart von Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen.

A : Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen (siehe Abb. 34);

B : Mitochondrien aus unbehandelten Zellen;

●—● : Zellsaft aus unbehandelten Zellen;

Δ---Δ : Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen;

▲—▲ : Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen (Korrektur für die erhöhte Leucinkonzentration der CHI-vorbehandelten Zellen (siehe auch Abb. 2)).

Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen wurden in vitro mit radioaktivem Leucin 90 min bei 25° C inkubiert (vgl. oben Kapitel 2.3.3.1.). Ein Teil des Inkubationsansatzes wurde anschließend mit PMSF und SDS-haltigem Puffer behandelt (Meth.). Die gelelektrophoretische Analyse dieser Probe ist in Abb. 36C gezeigt, die der Kontrolle (Mitochondrien aus CHI-unbehandelten Zellen) in Abb. 36A. In beiden Fällen treten die gleichen Radioaktivitätsmaxima in etwa den gleichen Verhältnissen zueinander auf. Die Maxima stellen Polypeptide mit scheinbaren Molekulargewichten von etwa 40000, 30000, 20000 und 14000 - 8000 dar. Der hohe Anteil der Radioaktivität im niedrigen Molekulargewichtsbereich zeigt, daß auch in Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen ein Abbau neu-synthetisierter Translationsprodukte stattfindet (vgl. auch Kapitel 2.3.3.1. mit Abb. 29). Er ist etwa ebenso ausgeprägt wie bei Mitochondrien aus unbehandelten Zellen. Diese Beobachtung zeigt, daß nach längerer CHI-Inkubation der Zellen keine Abnahme der proteolytischen Enzymaktivität im Mitochondrium stattfindet, das heißt, es handelt sich nicht um die im Ergebnisteil 2 beschriebenen vesikulären Proteinasen.

Ein zweiter Teil des Inkubationsansatzes wurde mit Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase behandelt. Abb. 36B und D zeigen die gelelektrophoretischen Analysen der Immunpräzipitate. Aus Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen konnten 3 - 5 % der in vitro inkorporierten Radioaktivität gefällt werden (Kontrolle: 4 - 6 %, vgl. auch Kapitel 2.1.8.2., Abb. 16). Man sieht, daß nur eine Radioaktivitätsbande auftritt. Sie stellt die Unter-einheit 3 der Cytochromoxidase dar. Es ist kein Unterschied zwischen dem Immunpräzipitat aus 'CHI-unbehandelten' Mitochondrien und demjenigen aus 'unbehandelten' Mitochondrien festzustellen (vgl. auch Kapitel 2.3.2.2.).

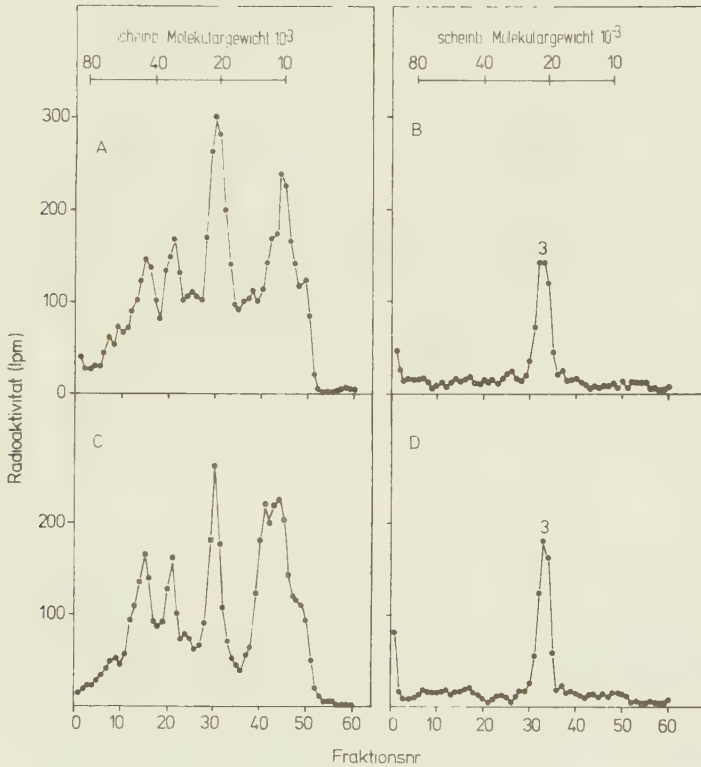


Abb. 36

Gelelektrophoretische Analyse der Proteinsynthese-Produkte isolierter Mitochondrien aus CHI-behandelten Zellen. Isolierte Mitochondrien wurden in Inkubationsmedium 90 min mit 3-H Leucin inkubiert (vgl. auch Abb. 34).

A : Mitochondrien aus unbehandelten Zellen;

C : Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen;

B : immunopräzipitierte Cytochromoxidase aus Mitochondrien aus unbehandelten Zellen;

D : immunopräzipitierte Cytochromoxidase aus Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen;

3 : Untereinheit 3 der Cytochromoxidase.

2.3.4.2. Polypeptide, die in Gegenwart von Zellsaft aus CHI-vergifteten Zellen hergestellt werden.

Mitochondrien aus unbehandelten und CHI-vorbehandelten Zellen wurden mit Zellsaft aus unbehandelten und aus CHI-vorbehandelten Zellen inkubiert (siehe Kapitel 2.3.3.2., Abb. 35). Abb. 37 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Syntheseprodukte. In Abb. 37A ist das homogene Markierungsmuster von CHI-vorbehandelten Mitochondrien dargestellt. Es stimmt nahezu vollständig mit dem homogenen Markierungsmuster von unbehandelten Mitochondrien überein (vgl. Abb. 29, 30). Damit ist gezeigt, daß ein Abbau mitochondrialer Proteine während der CHI-Vorinkubation nicht stattfindet (vgl. auch Kapitel 2.1.1.). Auch in den anderen in Abb. 37 dargestellten Versuchen konnte keine wesentliche Veränderung des homogenen Markierungsmusters beobachtet werden (hier nicht gezeichnet). Die Verteilung der in vitro eingebauten Radioaktivität über das Gel ist in allen vier Fällen sehr ähnlich.

Diese Beobachtungen lassen folgende Schlüsse zu:

1. Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen zeigen im in vitro Proteinsynthesesystem die gleichen Eigenschaften wie Mitochondrien aus unbehandelten Zellen. Sie synthetisieren die gleichen Polypeptide mit geringfügig verlangsamer Geschwindigkeit (siehe Abb. 35).
2. Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen hemmt den Abbau in vitro synthetisierter Polypeptide und stimuliert die Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien ebenso wie Zellsaft aus unbehandelten Zellen.

Wenn tatsächlich Untereinheiten-Vorstufen der Cytochromoxidase im Zellsaft die partielle Assemblierung der Cytochromoxidase in vitro ermöglichen (siehe Kapitel 2.3.2.2.), sollte Zell-

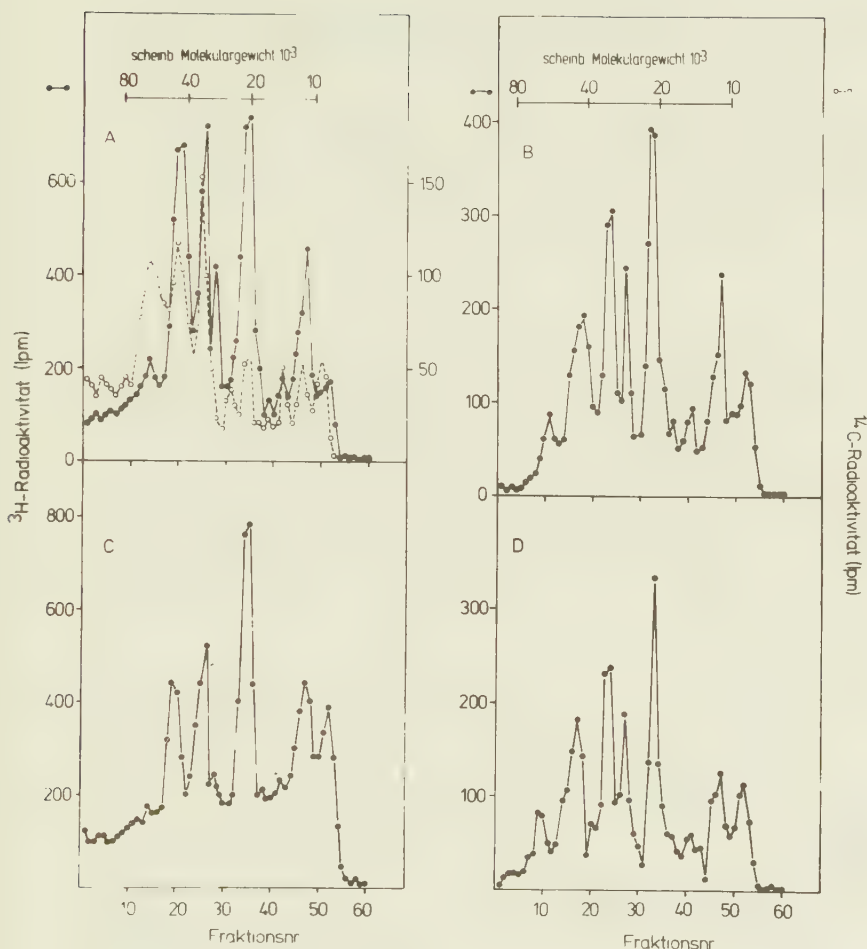


Abb. 37

Gelelektrophoretische Analyse von Mitochondrien, die *in vitro* in Gegenwart von Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen mit 3-H Leucin markiert wurden. Die Mitochondrien wurden 90 min inkubiert (vgl. Abb. 35).

- A, B : Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen;
 C, D : Mitochondrien aus unbehandelten Zellen;
 A, C : Inkubation mit Zellsaft aus unbehandelten Zellen;
 B, D : Inkubation mit Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen;
 $\bullet\text{---}\bullet$: *in vitro*-Markierung (3-H Leucin);
 $\circ\text{---}\circ$: homogene Markierung (14-C Leucin).

saft aus CHI-vorbehandelten Zellen diesen Effekt nicht zeigen. Voraussetzung dafür ist, daß die CHI-Vorbehandlung so lange dauert, bis ein weitgehender Verbrauch dieser Untereinheiten erfolgt ist. Aus den Experimenten von SCHWAB et al (34, 43) läßt sich entnehmen, daß dazu Zeiten von 100 min ausreichen. Zur Überprüfung dieser Überlegung wurden die in vitro Ansätze, die in Abb. 37 analysiert wurden, mit Antikörper gegen Cytochromoxidase behandelt.

Tabelle 5:

Immunopräzipitation von Cytochromoxidase nach in vitro Einbau von 3-H Leucin in Mitochondrien aus unbehandelten bzw. CHI-vorbehandelten Zellen in Gegenwart von Zellsaft aus unbehandelten bzw. CHI-vorbehandelten Zellen. Die Zahlen geben denjenigen Prozentsatz der gesamt-eingebauten 3-H Radioaktivität an, der sich im Immunopräzipitat findet.

		Mitochondrien aus	
		unbehandelten Zellen	CHI-vorbehandelten Zellen
Zellsaft aus	unbehandelten Zellen	12 - 15	10 - 12
	CHI-vorbehandelten Zellen	5 - 7	3 - 5

Tabelle 5 gibt die in den Immunopräzipitaten gefundene Radioaktivität (in % der Gesamtradioaktivität) wieder, und zwar für die vier möglichen Kombinationen von Mitochondrien und Zellsaft aus CHI-vorbehandelten und nicht-behandelten Zellen. Die Zahlen sind in zweifacher Hinsicht bemerkenswert:

1. Mitochondrien aus CHI-behandelten Zellen haben nahezu gleiche Mengen immunopräzipitierbarer Untereinheiten der Cytochromoxidase wie Mitochondrien aus unbehandelten Zellen.
2. Die Fähigkeit des Zellsaftes, die Bildung immunopräzipitierbarer Untereinheiten der Cytochromoxidase zu stimulieren, geht nach Vorinkubation der Zellen mit CHI vollständig verloren.

Die gelelektrophoretischen Analysen der Immunpräzipitate erklären dieses Ergebnis (Abb. 38). Wenn Mitochondrien, und zwar solche aus unbehandelten wie auch aus CHI-behandelten Zellen, mit Zellsaft aus nicht behandelten Zellen inkubiert werden, treten drei Radioaktivitätsmaxima auf (Abb. 38A und C). Diese stellen die Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochromoxidase dar. Werden die gleichen Mitochondrienpräparationen mit Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen inkubiert, tritt in beiden Fällen lediglich eine Radioaktivitätsbande auf (Abb. 38B und D). Sie entspricht der Untereinheit 3. Dieser Befund bestätigt die oben angestellte Vermutung, daß bei längerer CHI-Inkubation in der Zelle offenbar die Komponenten aufgebraucht werden, die in vitro im Zellsaft benötigt werden, damit die Untereinheiten 1 und 2 in einen immunopräzipitierbaren Komplex integriert werden können. Experimente in Kapitel 2.3.2.2. zeigten, daß die Komponenten, die im Zellsaft aus unbehandelten Zellen anwesend sind und die Präzipitierbarkeit der Untereinheiten 1 und 2 bewirken, wahrscheinlich cytoplasmatisch synthetisierte Untereinheiten (Untereinheit 6 und 7) darstellen (siehe auch Abb. 32).

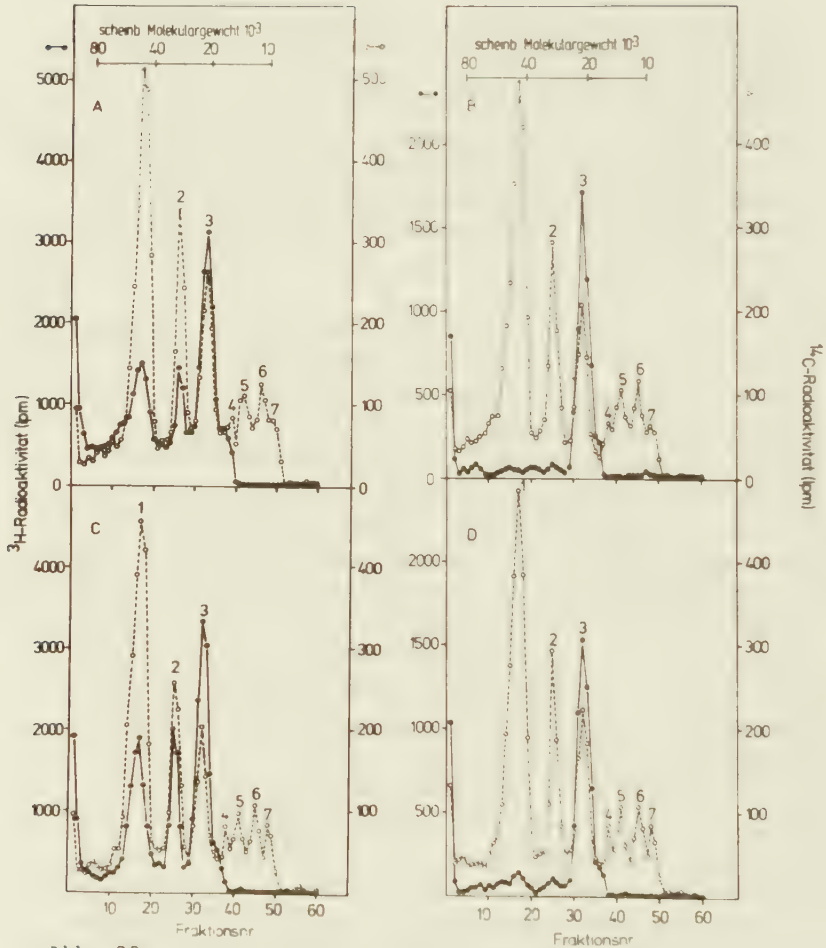


Abb. 38

Gelelektrophoretische Analyse von immunpräzipitierter Cytochromoxidase aus Mitochondrien, die in vitro in Gegenwart von Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen mit 3-H Leucin markiert wurden. Die homogen mit 14-C Leucin markierten Mitochondrien wurden 90 min inkubiert (siehe auch Abb. 35).

A, B : Immunpräzipitat aus Mitochondrien aus CHI-vorbehandelten Zellen;

C, D : Immunpräzipitat aus Mitochondrien aus unbehandelten Zellen;

A, C : Inkubation mit Zellsaft aus unbehandelten Zellen;

B, D : Inkubation mit Zellsaft aus CHI-vorbehandelten Zellen;

●—● : in vitro Markierung (3-H Leucin);

○---○ : homogene Markierung (14-C Leucin);

1 - 7 : Untereinheiten der Cytochromoxidase.

2.3.5. Translation von Komponenten der Cytochromoxidase an den cytoplasmatischen Ribosomen in vitro.

In den bisher dargestellten Experimenten wurden die cytoplasmatischen Ribosomen von den Mitochondrien abgetrennt. Die folgende Versuchsanordnung unterscheidet sich hiervon. Zellen wurden aufgeschlossen und Zellwände durch Zentrifugation abgetrennt. Im Zentrifugationsüberstand (Zellhomogenat) befinden sich unter anderem Mitochondrien und cytoplasmatische Ribosomen, die teilweise noch mit endoplasmatischen Membranen assoziiert sind. Diese Präparation wurde mit radioaktivem Leucin versehen und bei 25° C inkubiert.

Abb. 39 zeigt den Einbau von Leucin in TCA-unlösliche Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit von CHI. Dieser wurde anhand der eingebauten Radioaktivität und der Leucinkonzentration im Inkubationsansatz errechnet. In beiden Fällen erfolgt ein Einbau für etwa 30 - 40 min. Anschließend findet nur mehr eine geringe Inkorporation von Leucin statt: Der Einbau von Leucin in Abwesenheit von CHI ist 5 mal höher als in Gegenwart des Inhibitors. Die Zugabe eines Leucin-chases nach 30 min Inkubation bewirkt in beiden Fällen keine Abnahme des eingebauten Leucins.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Proteinsyntheseleistung von Mitochondrien in diesem System ebenso groß ist wie diejenige von isolierten Mitochondrien im ribosomenfreien Zellsaft (vgl. Abb. 27). Gleichzeitig wird demonstriert, daß an den cytoplasmatischen Ribosomen TCA-fällbare Polypeptide hergestellt werden.

Zur Analyse der in vitro mit radioaktivem Leucin markierten Polypeptide wurden die in vivo mit 14-C Leucin markierten Zellhomogenate nach 90 min Inkubation zunächst mit PMSF behandelt, um Proteinasen auszuschalten. Danach wurden die



Abb. 39

Kinetik des Einbaus von Leucin in Protein in einem Zell-homogenat. Der Einbau wurde anhand des Einbaus von 3-H Leucin bestimmt.

●—● : Einbau ohne weitere Zusätze;

○—○ : Einbau in Gegenwart von CHI (0,1 mg/ml);

Pfeil : nach 30 min Inkubation wurde zu aliquoten Proben 5 mM unmarkiertes Leucin zugegeben (unterbrochene Linie).

Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 40A zeigt das Markierungsmuster nach Inkubation in Abwesenheit von CHI, Abb. 40C zeigt dasjenige nach Inkubation in Gegenwart von CHI. Das ¹⁴C Markierungsmuster des Zellhomogenats ähnelt demjenigen ganzer Zellen (hier nicht dargestellt). Der geringe Anteil an Radioaktivität in Produkten mit niedrigen scheinbaren Molekulargewichten (etwa 8000 - 14000) zeigt, daß während der Inkubation bzw. danach kein proteolytischer Abbau von in vivo gebildeten Polypeptiden stattfindet.

Das 3-H Markierungsmuster des Zellhomogenats in Gegenwart von CHI ist nahezu identisch mit demjenigen isolierter Mitochondrien, die mit Zellsaft in vitro inkubiert wurden (vgl. Abb. 29C): 4 prominente Radioaktivitätsmaxima mit scheinbaren Molekulargewichten von etwa 40000, 30000, 20000 und 11000 sind sichtbar. Das 3-H Markierungsmuster des in Abwesenheit von CHI inkubierten Zellhomogenats ist deutlich verschieden. Die Radioaktivität verteilt sich nahezu gleichmäßig über das Gel. Auch von dem ¹⁴C Markierungsmuster unterscheidet es sich beträchtlich. Die gelelektrophoretischen Analysen zeigen somit:

1. Die im Zellhomogenat enthaltenen Mitochondrien bilden Translationsprodukte, die den in vivo in Gegenwart von CHI gebildeten sehr ähnlich sind (siehe Kapitel 2.1.8.1.).
2. Die cytoplasmatischen Ribosomen im Zellhomogenat bilden Proteine, deren Molekulargewichte mit denjenigen der in vivo gebildeten weitgehend übereinstimmen. Der höhere Anteil an Translationsprodukten mit niedrigen Molekulargewichten ist möglicherweise auf eine mangelhafte Translation zurückzuführen.

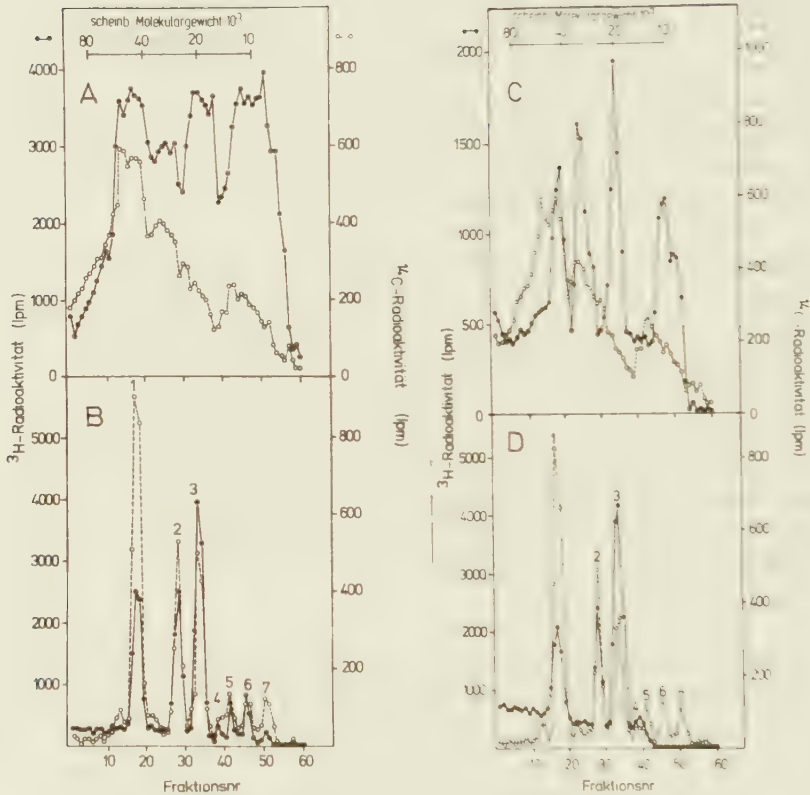


Abb. 40

Gelelektrophoretische Analyse der in einem Zellhomogenat synthetisierten Proteine. Homogen mit ^{14}C Leucin markierte Zellen wurden aufgeschlossen und Zellwände wurden durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde 90 min mit ^3H Leucin inkubiert.

A, B : Inkubation ohne weitere Zusätze;

C, D : Inkubation in Gegenwart von CHI;

A, C : Analyse aller Proteine im Inkubationsansatz;

B, D : Analyse der immunopräzipitierten Cytochromoxidase;

1 - 7: Untereinheiten der Cytochromoxidase.

Die in vitro mit 3-H Leucin inkubierten Zellhomogenate wurden mit Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase behandelt. Der Antikörper fällt bei der mit CHI inkubierten Probe 12 - 16 % der inkorporierten 3-H Radioaktivität. Dies entspricht etwa der Menge, die nach in vitro Inkubation isolierter Mitochondrien mit Zellsaft (vgl. Kapitel 2.3.2.2.) immunopräzipitiert wird. Aus Proben, die nicht mit CHI inkubiert wurden, können etwa 3 - 3,5 % mit Antikörper gefällt werden. In beiden Fällen wurden gleichzeitig zwischen 1 - 1,5 % der homogenen 14-C Radioaktivität präzipitiert.

Abb. 39B und D zeigen die gelelektrophoretischen Analysen der Immunopräzipitate:

Das 14-C Markierungsmuster ist in beiden Fällen gleich. Alle 7 Untereinheiten der Cytochromoxidase werden präzipitiert. In Gegenwart von CHI (Abb. 40D) ist das in vitro Markierungsmuster identisch mit demjenigen von Immunopräzipitaten aus isolierten Mitochondrien, die in Gegenwart von Zellsaft mit radioaktivem Leucin inkubiert wurden (vgl. Abb. 31C). Drei Radioaktivitätsmaxima mit scheinbaren Molekulargewichten von 41000, 28000 und 20000 sind sichtbar. Sie entsprechen den Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochromoxidase. Ein kleines Maximum mit einem Molekulargewicht von etwa 15000 stellt eine Verunreinigung dar. Es fehlt in manchen Versuchen völlig. In Abwesenheit von CHI finden sich im in vitro Markierungsmuster insgesamt sieben Radioaktivitätsmaxima (Abb. 40B). Drei prominente Gipfel entsprechen den Untereinheiten 1, 2 und 3. Vier kleine Gipfel haben scheinbare Molekulargewichte von 16000, 14000, 11000 und 8500. Sie besitzen die gleiche gelelektrophoretische Beweglichkeit wie die Untereinheiten 4 - 7 der Cytochromoxidase. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn, statt aus dem gesamten Homogenat mit Antikörper zu fällen, die Mitochondrien zuerst isoliert und gewaschen wurden und daraus die Immunopräzipitation durchgeführt wurde.

Auf der Basis dieser Beobachtungen kann folgendes geschlossen werden:

1. Cytoplasmatische Ribosomen können in dem beschriebenen Zellhomogenat Untereinheiten der Cytochromoxidase synthetisieren.
2. Die in vitro gebildeten cytoplasmatischen Untereinheiten gelangen in die Mitochondrien und werden dort integriert.
3. Wie in Kapitel 2.3.2.3. ausgeführt, besteht Veranlassung zu der Annahme, daß der verwendete Antikörper nicht die freien cytoplasmatisch synthetisierten Untereinheiten erkennt. Deshalb darf vermutet werden, daß in dem Zellhomogenat eine Assemblierung sämtlicher Untereinheiten der Cytochromoxidase stattfinden kann. Ob dabei die Bildung eines funktionsfähigen Cytochromoxidase-Moleküls stattfindet, läßt sich auf der Grundlage der vorliegenden Experimente nicht entscheiden.

3. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zum Verständnis der Koordination von cytoplasmatischer und mitochondrialer Proteinsynthese bei der Bildung der Mitochondrien liefern. Es ist klar, daß Wechselbeziehungen zwischen diesen beiden von zwei eigenen genetischen Systemen gesteuerten Prozessen auf mehreren Ebenen zu erwarten sind. Um diese Wechselbeziehungen zu erfassen, bietet sich die Möglichkeit an, experimentell aus dem in der intakten Zelle bestehenden Gleichgewicht auszulenken und auf Grund der beobachteten Effekte diejenigen Vorgänge und Faktoren zu erfassen, die den Gleichgewichtszustand von cytoplasmatischer und mitochondrialer Proteinsynthese gewährleisten.

Für solche Eingriffe sind mehrere experimentelle Anordnungen verfügbar. So kann entweder die mitochondriale oder die cytoplasmatische Proteinsynthese ausgeschaltet werden. Für den ersten Fall bietet sich eine Reihe von Mutanten, z. B. in Bäckerhefe, an, so etwa die sogenannten "Petite Mutationen" (60 - 63). Des weiteren können metabolische Zustände in diesen Organismen induziert werden, wie Anaerobiose und Glucoserepression, unter denen die mitochondriale Proteinsynthese stark herabgesetzt ist. In diesen Versuchssystemen können freilich nur längerfristige Auswirkungen der Aufhebung des Gleichgewichts verfolgt werden. Sowohl zu langfristigen als auch zu kurzfristigen Auslenkungen eignen sich spezifisch auf die mitochondriale Proteinsynthese wirkende Inhibitoren, wie Chloramphenicol (64, 65) und Erythromycin (66). Insbesondere unter Zuhilfenahme von Chloramphenicol ist eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden. Bei Mikroorganismen (Hefe und Neurospora) hat sich gezeigt, daß die cytoplasmatische Proteinsynthese in ihrer Aktivität anscheinend von der mitochondrialen nicht abhängig ist, d.h. zum Beispiel

Neurospora-Zellen wachsen in Anwesenheit von Chloramphenicol mit nahezu der gleichen Geschwindigkeit wie Kontrollzellen. Die Mitochondrien freilich zeigen in ihrer Zusammensetzung und Funktion ganz wesentliche Unterschiede, da die essentiellen Komponenten wie Cytochromoxidase, Cytochrom b ausfallen. Weiterhin haben die Untersuchungen ergeben, daß manche mitochondrialen Komponenten, wie etwa Cytochrom c, die im Cytoplasma gebildet werden, in erhöhten Konzentrationen auftreten, und daß die Menge der Mitochondrien in der Zelle etwa verdoppelt wird (67). Die diesen Phänomenen zugrundeliegenden Mechanismen, die regulativ wirkenden Komponenten, sind nicht bekannt. Es ist zu vermuten, daß die Zunahme der cytoplasmatischen Leistung hinsichtlich der Mitochondrien, keine spezifische Antwort auf das Ausfallen der mitochondrialen Proteinsynthese darstellt. Dies geht aus Beobachtungen hervor, die mit Kupfermangel-Zellen erhoben wurden (68 - 69). In diesem Fall läuft die mitochondriale Proteinsynthese weiter, aber die Cytochromoxidase als spezifisch Kupfer-haltiges Enzym fällt aus. Hinsichtlich der Synthese der mitochondrialen Proteine werden jedoch sehr ähnliche Beobachtungen gemacht, wie in Chloramphenicol gehemmten Zellen (68, 70). Diese Befunde zeigen, daß offensichtlich die Mechanismen, mit denen die Zellen auf das Ausfallen der mitochondrialen Proteinsynthese antworten, so komplex sind, daß sie mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methoden und auf der Basis des gegenwärtigen Erkenntnisstandes auch nicht annähernd erfaßt werden können.

In dieser Arbeit sollte die Abhängigkeit der mitochondrialen Proteinsynthese von der cytoplasmatischen untersucht werden. Es konnte davon ausgegangen werden, daß eine wesentlich engere Kopplung als im umgekehrten Fall bestehen sollte. Das war schon deshalb zu erwarten, da die Komponen-

ten des mitochondrialen Syntheseapparates - und zwar soweit bekannt alle - von der cytoplasmatischen Proteinsynthese hergestellt werden. Das heißt, die Experimente wurden von vorneherein auf die Erfassung kurzfristiger Reaktionen gerichtet. Als experimentelles System bot sich dabei der Einsatz von Cycloheximid an, einem spezifischen Hemmstoff der Translation an den cytoplasmatischen Ribosomen. Die Konfrontation von Neurospora Zellen mit diesem Hemmstoff ist als ein durchaus physiologisches Ereignis anzusehen, da Cycloheximid als natürlich vorkommendes Antibiotikum (in Streptomyces griseus) sicherlich eine wichtige Rolle in der Ökologie von Pilzen spielt. Cycloheximid erfüllt des weiteren eine Reihe von experimentellen Voraussetzungen: Es hemmt hochspezifisch in geringen Konzentrationen, es hemmt quantitativ und es hemmt außerordentlich schnell, d.h. innerhalb von Sekunden nach Kontakt mit den Zellen.

Zur Erfassung der spezifischen Antwort der Zellen auf die Cycloheximid-bedingte Blockierung der cytoplasmatischen Proteinsynthese wurden drei zeitlich aufeinanderfolgende Vorgänge untersucht:

- 1) die Translation an mitochondrialen Ribosomen,
- 2) die Integration der fertiggestellten Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran,
- 3) die Assemblierung mitochondrialer Translationsprodukte zu größeren Komplexen am Beispiel der Cytochromoxidase.

3.1. Translation an den mitochondrialen Ribosomen nach Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese.

Voraussetzung für die Untersuchung der Proteinsynthese an den mitochondrialen Ribosomen in vivo in Gegenwart von Cycloheximid ist die Kenntnis von Nebeneffekten, denen bisher insbesondere bei Markierungsexperimenten mit radio-

aktiven Aminosäuren nur wenig Beachtung geschenkt wurde. Es handelt sich vor allem um die Veränderungen der Konzentrationen der intrazellulären Aminosäuren. Andere Effekte, deren Einfluß unter den jeweiligen experimentellen Situationen sehr schwer bestimmbar waren (z. B. die erhöhte Metabolisierung von Aminosäuren in Gegenwart von Cycloheximid, die verlangsamte Aufnahme von Aminosäuren nach längerer Cycloheximid-Inkubation der Zellen u.a.), konnten durch die Anwendung eines "Puls-Chase"-Verfahrens ausgeschaltet werden. Dieses Verfahren erlaubte, daß bei der Berechnung der mitochondrialen Proteinsyntheserate allein die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen als variable Parameter berücksichtigt werden mußten. Freilich sind bei diesem Verfahren folgende Umstände als mögliche Fehlerquellen zu bedenken: Es ist nicht bekannt, ob Aminosäuren im Cytoplasma und in den Mitochondrien in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden sind. Bei der Berechnung der mitochondrialen Syntheserate wurde jedoch davon ausgegangen, daß diese möglichen Konzentrationsunterschiede keine Rolle spielen. Die Berechtigung zu dieser Annahme ergibt sich aus folgenden Überlegungen und Beobachtungen:

Radioaktive Aminosäuren, die zur Bestimmung der Syntheserate zum Kulturmedium zugesetzt werden, müssen auf ihrem Weg zum Mitochondrium zunächst den cytoplasmatischen Aminosäurepool durchfließen. Gleichgültig wie groß der cytoplasmatische Pool im Vergleich zum mitochondrialen Pool ist, muß die spezifische Radioaktivität des mitochondrialen Pools zunächst niedriger sein als diejenige nach der gleichmäßigen Verteilung der radioaktiven Aminosäuren auf beide Pools. Das bedeutet, daß die mitochondriale Syntheserate allenfalls zu klein wäre, wenn diese anhand des Einbaus von Radioaktivität und der Aminosäurekonzentration in den ganzen Zellen ermittelt wird. Die so berechneten Einbaudaten zeigen, daß die Synthese mitochondrialer Translationspro-

dukte nach Vergiftung der Zellen mit Cycloheximid für mindestens eine halbe Verdopplungsperiode nicht nachläßt.

Der Befund, daß die Translation an mitochondrialen Ribosomen langfristig nach Zugabe von Cycloheximid in ganzen Zellen nicht abnimmt, ist nicht in Übereinstimmung mit der von anderen Autoren geäußerten Vermutung, daß die Herstellung mitochondrialer Translationsprodukte eng an die Synthese cytoplasmischer Translationsprodukte gekoppelt ist (vgl. Einleitung, (4, 15 - 23, 71)). Die in dieser Arbeit dargestellten in vivo und in vitro Untersuchungen führen zu der Annahme, daß das Zusammenspiel der beiden Proteinsynthesesysteme so geregelt ist, daß beim Ausfallen des cytoplasmatischen Systems das mitochondriale System für längere Zeit uneingeschränkt weiterhin Produkte synthetisiert. Es kann argumentiert werden, daß dies physiologisch sinnvoll ist: Die Zelle muß darauf eingestellt sein, daß die cytoplasmatische Proteinsynthese wieder anläuft, und dann mitochondrial gebildete Komponenten als "Partnerproteine" sofort zur Verfügung stehen. Die in diesem Zusammenhang auftretende Frage nach wievielen Verdopplungsperioden die mitochondriale Proteinsynthese aufhört, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden.

3.2. Integration von mitochondrialen Translationsprodukten in die mitochondriale Innenmembran nach Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese.

Nach kurzen Cycloheximid-Inkubationszeiten werden in ganzen Zellen alle mitochondriale Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran integriert. Der Anteil der mitochondrialen Translationsprodukte, die in die Membran

integriert werden, nimmt innerhalb der ersten 30 min nach Zugabe von Cycloheximid jedoch stark ab. Er beträgt nach 30 min nur noch 40 %. Nach längeren Inkubationszeiten ändert sich dieser Anteil nur mehr geringfügig. Er bleibt während der Zeit eines Zellzyklus annähernd konstant. Das bedeutet, daß auch nachdem der Nachschub cytoplasmatischer Translationsprodukte für längere Zeit gestoppt ist, ein beträchtlicher Teil der mitochondrialen Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran integriert wird.

Das quantitative Verhältnis der einzelnen neuintegrierten Polypeptide verändert sich nach längerer Cycloheximid-Inkubation ganzer Zellen nur geringfügig. Allerdings nehmen Polypeptide mit niedrigen scheinbaren Molekulargewichten (kleiner als 15000) stark zu (siehe nächstes Kapitel). Die integrierten Produkte sind stabil. Sie werden durch weitere Inkubation der Zellen in Gegenwart von Cycloheximid weder abgebaut noch feststellbar verändert.

Wahrscheinlich beruht die höhere Integrationsrate nach kurzer Cycloheximid Inkubation auf das Vorhandensein cytoplasmatisch synthetisierter Polypeptid-Pools. Schwab et al. (34, 43) zeigten, daß bei der Cytochromoxidase von *Neurospora crassa* die Vorstufen-Pools der einzelnen cytoplasmatisch gebildeten Untereinheiten bis zu 25 % der bereits integrierten Untereinheiten-Mengen betragen können. Wäre die Vorstufe mit dem größten Pool für die Integration sämtlicher mitochondrialer Translationsprodukte ausschlaggebend, könnten somit für etwa 50 min sämtliche neusynthetisierten mitochondrialen Produkte in die Innenmembran integriert werden, bis der Pool erschöpft ist.

Die Experimente mit isolierten Mitochondrien zeigen, daß auch in vitro mitochondriale Translationsprodukte in die

mitochondriale Membran integriert werden. Über 95 % der neusynthetisierten Produkte werden in vitro in die Membran eingefügt. Mitochondrien, die aus Zellen isoliert wurden, die für eine halbe Verdopplungsperiode mit Cycloheximid vorinkubiert waren, unterscheiden sich dabei nicht von Mitochondrien aus unbehandelten Zellen. Lediglich wenn in vitro in Abwesenheit von Inhibitoren mitochondrialer Proteinasen inkubiert wurde (siehe nächstes Kapitel), werden etwa 20 - 30 % der neusynthetisierten mitochondrialen Translationsprodukte nicht in die mitochondriale Membran integriert. In diesem Zusammenhang sind zwei Feststellungen wichtig:

- 1) nach Inkubation in vitro finden sich mitochondriale Produkte in der mitochondrialen Membran, die in vivo in Gegenwart von Cycloheximid nicht integriert werden. Diese Produkte stellen mit größter Wahrscheinlichkeit proteolytische Abbauprodukte von mitochondrialen Translationsprodukten dar;
- 2) die Proteinsyntheserate isolierter Mitochondrien beträgt maximal 6 % der in vivo Proteinsyntheserate von Mitochondrien in Gegenwart von Cycloheximid. Die Integration in vitro synthetisierter Translationsprodukte in die mitochondriale Membran darf deshalb nur unter Vorbehalt mit der Situation in vivo verglichen werden.

Diese Befunde führen zu der Hypothese, daß die Koordination der mitochondrialen und cytoplasmatischen Proteinsynthese so geregelt ist, daß beim Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese nicht die mitochondriale Translation, sondern die Integration mitochondrialer Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran zu einem gewissen Grad herabgesetzt wird. Im nächsten Kapitel dieser Arbeit werden Ergebnisse diskutiert, die darauf hinweisen, daß der Teil der mitochondrialen Translationsprodukte, der nicht in die mitochondriale Membran integriert wird, proteolytisch abgebaut wird. Eine Vermutung in diesem Sinne wurde von SCHATZ und MASON (4) auf der Basis der Untersuchungen von EBNER et al (72) geäußert. EBNER et al. gelang es, bei Cyto-

chromoxidase-defizienten Kern-Mutanten von Bäckerhefe (z. B. pet 494) zu zeigen, daß trotz funktionierender Translation an mitochondrialen Ribosomen bestimmte Translationsprodukte (Untereinheiten der Cytochromoxidase) nicht in der mitochondrialen Membran auftreten. Das heißt, sie werden entweder nicht gebildet, oder zwar gebildet, aber nicht in die Membran integriert. Da sie in diesen Untersuchungen auch nicht in ganzen Zellen nachzuweisen waren, würde die zweite Möglichkeit implizieren, daß sie sehr schnell abgebaut werden. Die Mutation pet 494 konnte durch Einführung eines amber-Suppressors supprimiert werden, so daß wieder der Phänotyp des Wildtyps zu beobachten war (73). Das bedeutet, daß diese Mutationen möglicherweise Polypeptide betreffen, die im Cytoplasma synthetisiert werden und an der Integration mitochondrialer Translationsprodukte beteiligt sind. Dies wurde von SCHATZ und MASON als Argument für die Interpretation gewertet, daß in der Mutante pet 494 nicht die Synthese, sondern die Integration eines mitochondrialen Translationsproduktes (Untereinheit 3 der Cytochromoxidase) gestört ist (4).

3.3. Rolle von Proteinasen und Inhibitoren bei der Integration mitochondrialer Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran.

Im letzten Kapitel wurde die Hypothese diskutiert, daß beim Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese die mitochondrialen Translationsprodukte, die nicht in die mitochondriale Membran integriert werden, durch Proteinasen abgebaut werden. Um diese Vermutung weiter zu untersuchen, erwies es sich als notwendig, die Wirkungen von solchen spezifischen Proteinasen klar von unspezifischen Wirkungen durch andere zelluläre Proteinasen abzugrenzen. Tatsächlich werden Vesikel, die Proteinasen enthalten, zusammen mit den Mitochondrien isoliert. Die Proteinasen dienen in vivo wahr-

scheinlich nach Ausscheidung in den extrazellulären Raum zur Versorgung der Zelle mit Aminosäuren (45, 46). Nach Aufbrechen der Zellen können sie, vor allem in Gegenwart von Detergentien, unspezifisch alle Mitochondrienproteine verdauen. Auf Grund dieser Erfahrungen wurden Methoden entwickelt, mit deren Hilfe diese Proteinasen ausgeschaltet werden konnten. Dies war Voraussetzung für die Erfassung der in vivo und in vitro auftretenden mitochondrialen Translationsprodukte und damit für den Nachweis intramitochondrialer Proteinasen, die spezifisch mitochondriale Translationsprodukte abbauen.

Experimente mit isolierten Mitochondrien demonstrieren, daß in den Mitochondrien spezifische Proteinasen existieren, die in vitro neusynthetisierte Translationsprodukte abbauen können, ohne Produkte anzugreifen, die bereits in die mitochondriale Innenmembran integriert sind. Die Aktivität dieser Proteinasen kann in vitro durch Einsatz einer aus ganzen Zellen isolierten Inhibitor-Fraktion gehemmt werden.

Untersuchungen an intakten Zellen in Gegenwart von Cycloheximid zeigen, daß nur ein Teil der mitochondrialen Translationsprodukte nach längerem Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese in mitochondriale Membran integriert wird (vgl. oben). Die Experimente geben Anlaß zu der Annahme, daß mitochondriale Translationsprodukte, die nicht integriert werden, zu größeren Bruchstücken abgebaut werden (Molekulargewicht etwa 7000 - 15000).

Folgende Hypothese kann auf der Grundlage dieser Ergebnisse aufgestellt werden:

Mitochondrien besitzen Proteinasen, die unter bestimmten Bedingungen mitochondriale Translationsprodukte vor deren Integration in die mitochondriale Innenmembran abbauen.

Dadurch können diese Proteinasen indirekt die in den Mitochondrienmembranen vorhandenen Mengen der mitochondrialen Translationsprodukte regeln. Die Proteinasen werden vor allem dann aktiv, wenn die cytoplasmatische Proteinsynthese und damit der Nachschub cytoplasmatisch gebildeter Mitochondrienproteine ausfällt.

In vitro werden diese Proteinasen durch eine aus ganzen Zellen isolierten Inhibitor-Fraktion inaktiviert, somit ist es vorstellbar, daß auch in vivo die Proteinaseaktivität durch Inhibitoren geregelt wird. In diesem Zusammenhang besteht jedoch noch keine Vorstellung, wie die Inhibitorenaktivität durch cytoplasmatisch synthetisierte Mitochondrienproteine beeinflußt werden kann. Weiterhin ist denkbar, daß diese Proteinasen in vivo auch andere Aufgaben erfüllen können. Zum Beispiel ist die Beseitigung unvollständiger und aberranter Translationsprodukte der mitochondrialen Proteinsynthese vorstellbar (74 - 77).

Im letzten Kapitel wurde die von SCHATZ und MASON (4) geäußerte Ansicht dargestellt, daß ein Kern-kodiertes Protein existieren könnte, dessen Synthese Voraussetzung für die Integration mitochondrialer Translationsprodukte ist. Die Autoren äußerten die Vermutung, es handele sich um ein 'Organisatorprotein', das bei der Integration und Assemblierung von mitochondrialen Translationsprodukten (Untereinheiten der Cytochromoxidase) teilnimmt. Die hier gemachten Beobachtungen bieten auch folgende Erklärung an: Es könnte sich um einen Inhibitor handeln, der eine intramitochondriale Proteinase hemmt, die mitochondriale Translationsprodukte abbauen kann.

In diesem Zusammenhang erscheint es denkbar, daß in vielen Kernmutanten, in denen abartige mitochondriale Translations-

produkte auftreten bzw. in denen manche mitochondriale Translationsprodukte fehlen, intramitochondriale Proteinasen aktiv werden. Neben den oben erwähnten *Saccharomyces cerevisiae* - Mutanten von EBNER (60), in denen Untereinheiten der Cytochromoxidase fehlen, wurde kürzlich eine Kernmutante von *Neurospora crassa* (*Neurospora cni-1*) beschrieben, in der hauptsächlich mitochondriale Translationsprodukte mit scheinbaren Molekulargewichten von 7000 - 10000 auftreten (78). Die Autoren erklären u.a., daß dies möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß mitochondriale Translationsprodukte mit höheren scheinbaren Molekulargewichten durch Proteinasen abgebaut werden. Dies ist in Einklang mit der oben dargestellten Argumentation.

3.4. Assemblierung der mitochondrial synthetisierten Untereinheiten der Cytochromoxidase.

Nach Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese werden für etwa die Zeit einer Verdopplungsperiode der Zellen an den mitochondrialen Ribosomen noch Untereinheiten der Cytochromoxidase synthetisiert. Diese werden teilweise in die mitochondriale Membran integriert. Das quantitative Verhältnis der Untereinheiten, die integriert werden, verändert sich während dieser Zeit nur geringfügig (vgl. oben).

Mit Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase kann gezeigt werden, daß die Präzipitation aller neugebildeten mitochondrialen Untereinheiten nach Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese von zwei Umständen abhängig ist:

1. von der Anwesenheit cytoplasmatisch synthetisierter Polypeptide, die wahrscheinlich Untereinheiten der Cytochromoxidase darstellen, und
2. von den Präzipitationsbedingungen. (Dieser Punkt ist ausführlich in Kapitel 2.1.8.2. behandelt worden.)

Die erste Feststellung ergibt sich aus folgenden Beobachtungen:

Sämtliche mitochondrialen Untereinheiten, die in vivo in Gegenwart von Cycloheximid synthetisiert und in die mitochondriale Membran integriert werden, können nur dann aus isolierten Mitochondrien mit Antikörper gefällt werden, wenn die cytoplasmatische Proteinsynthese erst für kurze Zeit ausgeschaltet war. Wie oben dargestellt (Kapitel 3.2.) sind kurze Zeit, nachdem die cytoplasmatische Proteinsynthese ausgeschaltet wurde, noch Polypeptid-Pools vorhanden, die möglicherweise die Integration mitochondrialer Translationsprodukte ermöglichen. Entsprechend kann vermutet werden, daß auch die Assemblierung von mitochondrialen Untereinheiten zu präzipitierbaren Komplexen von dem Vorhandensein von Polypeptid-Pools cytoplasmatischen Ursprungs abhängig sind. Diese Vermutung wird durch Experimente mit isolierten Mitochondrien bestätigt. Es zeigte sich, daß in vitro die Integration von neusynthetisierten mitochondrialen Untereinheiten (1 und 2) in einen Komplex, der mit Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase präzipitiert werden kann, von der Anwesenheit cytoplasmatisch synthetisierter Polypeptide im Inkubationsmedium abhängig ist. Diese Polypeptide befinden sich nach Aufschluß ganzer Zellen in der Cytosol-Fraktion. Sie sind nach längerer Inkubation der Zellen in Gegenwart von Cycloheximid nicht mehr vorhanden. Zwei dieser Polypeptide werden in vitro in einen Komplex integriert, der mit Antikörper gefällt wird. Sie besitzen die gleichen scheinbaren Molekulargewichte wie die cytoplasmatisch gebildeten Untereinheiten 6 und 7 der Cytochromoxidase.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, daß mitochondriale und cytoplasmatische Untereinheiten nach dem Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese teilweise zu Cytochromoxidase oder zu größeren Vorstufen assembliert werden. Die (Teil-) Assemblierung von cytoplasmatischen und mitochondrialen Unter-

einheiten ist wahrscheinlich Voraussetzung dafür, daß mitochondriale Untereinheiten mit Antikörper gegen intakte Cytochromoxidase präzipitiert werden.

3.5. Ausblick

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde haben eine Reihe von Problemen aufgeworfen, die im Hinblick auf die Aufklärung der koordinierenden Mechanismen bei der Bildung der Mitochondrien besondere Aufmerksamkeit und weitere Bemühungen zu verdienen scheinen:

- 1) Die Rolle der intramitochondrialen Proteinasen und deren Inhibitoren bei der Regelung der Mengen mitochondrialer Translationsprodukte sollte an ausgesuchten Beispielen, etwa Cytochrom-defizienten Kern-Mutanten, genauer untersucht werden. Spezifische Abbauprodukte sollten erfaßt werden. Die Proteinasen und Inhibitoren müßten isoliert und charakterisiert werden.
- 2) Das beschriebene in vitro System sollte weiterentwickelt werden, um die Bildung von Cytochromoxidase aus einzelnen cytoplasmatischen und mitochondrialen Untereinheiten zu studieren. Ferner sollte in vitro untersucht werden, an welcher Art von cytoplasmatischen Ribosomen (freie oder gebundene) Mitochondrienproteine gebildet werden. Weiterhin sollte das in vitro System zur Aufklärung des Mechanismus eingesetzt werden, der dem Transfer der cytoplasmatisch gebildeten Mitochondrienproteine vom Ort der Synthese zum Funktionsort zugrundeliegt.
- 3) Es sollte untersucht werden, ob eine Bildung von Cytochromoxidase in einem membranfreien, d.h. detergenshaltigem System möglich ist.

- 4) Die Antwort der cytoplasmatischen Proteinsynthese auf das Ausschalten der mitochondrialen Proteinsynthese sollte am Beispiel von definierten Proteinen (z. B. Untereinheiten der Cytochromoxidase) untersucht werden. So wäre insbesondere interessant, ob nach Abschalten der Produktion mitochondrialer Translationsprodukte spezifisch die Transkription und Translation reprimiert werden, die für die Bildung cytoplasmatischer Partnerproteine verantwortlich sind, oder etwa auch hier proteolytische Prozesse regulativ wirken.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Züchtung von *Neurospora crassa*.

Konidien von *Neurospora crassa* (Wildtyp 74A) wurden in VOGEL's Minimalmedium (79) inokuliert (2×10^6 Konidien pro ml) und die Suspension unter steriler Belüftung bei 25°C inkubiert. Die Zuchtdauer betrug 16 - 18 Stunden.

4.2. Isolierung von Mitochondrien.

4.2.1. Isolierung nach Aufschluß der Zellen mit einer Mühle.

Die Hyphen (Ausbeute etwa 8 - 10 g Feuchtgewicht pro Liter Zuchtmedium) wurden auf einer Nutsche abgesaugt und mit kaltem Wasser und Isolationsmedium (0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,44 M Saccharose, pH = 7,5) gewaschen. Die Hyphen wurden dann in etwa 10 Volumina (bezogen auf das Feuchtgewicht) eiskaltem Isolationsmedium resuspendiert und 1 min in einem Braun-Mixer homogenisiert. Die Zellen wurden in einer von WEISS et al (80) beschriebenen Mühle aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Material wurde zur Isolierung der Mitochondrien wie folgt zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Rotor-Typ SS 34) : 5 min $1500 \times g$; der Überstand 20 min $17500 \times g$. Das Sediment der zweiten Zentrifugation wurde in Isolationsmedium resuspendiert und auf die gleiche Weise nochmals abzentrifugiert. Im resultierenden Sediment befanden sich die gewaschenen Mitochondrien.

4.2.2. Isolierung nach Aufschluß der Zellen mit Quarzsand.

Die abgesaugten und mit Eiswasser gewaschenen Zellen wurden bei 0°C mit Quarzsand und Isolationsmedium (Verhält-

nis 1 : 1 : 1/2 w/w/w; Medium: vgl. oben 4.2.1.) in einem Mörser etwa 5 - 7 min gerieben. Anschließend wurden weitere 3 bis 4 Teile Isolationsmedium zugesetzt und im Mörser homogenisiert. Das Homogenat wurde 5 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals mit 1 bis 2 Teile Isolationsmedium sorgfältig resuspendiert und bei 1500 x g zentrifugiert. Die Überstände beider Zentrifugationsläufe wurden vereinigt. Mitochondrien wurden 20 min bei 17500 x g abzentrifugiert und einmal gewaschen, wie unter 4.2.1. beschrieben.

4.3. Isolierung mitochondrialer Membranen.

Isolierte Mitochondrien (vgl. unter 4.2) wurden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8) beschallt (6 x 15 sec Stufe 6, Branson Sonifier, Modell S 75). Die Probe wurde währenddessen im Eisbad gut gekühlt. Nach einer Clarifying-Zentrifugation (20 min, 17500 x g) wurden die unlöslichen Membranbestandteile von den löslichen Matrixproteinen durch Ultra-Zentrifugation getrennt (60 min, 144000 x g).

4.4. Untersuchung ganzer Zellen.

4.4.1 Extraktion der Proteine mit Detergentien.

Zellen wurden auf einer Nutsche abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie sofort mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einem Mörser zu Pulver zerrieben. 100 - 150 mg des Pulvers wurden mit SDS- bzw. Triton-haltigem Puffer (1 : 4) (1,5-%iges SDS, 0,1 M Tris-HCl, pH 8 bzw. 5-%iges Triton X - 100 in 0,1 M Natriumphosphat, pH 8) 5 min

bei 0°C behandelt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt (10 min, 27000 x g).

4.4.2. Aufschluß der Zellen mit Quarzsand.

Zellen wurden isoliert und mit Quarzsand zerrieben, wie unter 4.2.2. beschrieben. Nach der ersten Zentrifugation wurde das Sediment nochmals insgesamt dreimal resuspendiert und abzentrifugiert (3 x 5 min, 1500 x g). Die Resuspendierung erfolgt mit 1 Teil Isolationsmedium im Mörser. Die Überstände wurden vereinigt.

4.5. Dünnschichtchromatographie von Leucin und Leucinmetabolite im Kulturmedium.

Etwa 50 µl Kulturmedium wurden auf eine Kieselgelplatte (Fertigplatte der Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Platte wurde mit Äther/12 n HCl (100 : 1) in der ersten Dimension entwickelt (10 cm). In der zweiten Dimension wurde sie mit Butanol/Eisessig/H₂O (4 : 1 : 1) entwickelt (10 cm). Die Verteilung der Radioaktivität über die Kieselgelplatte wurde nach Auskratzen einzelner Kieselgel-Fractionen ermittelt (vgl. 4.15). Die Anfärbung mit Ninhydrien bzw. Dinitrophenylhydrazin erfolgte wie in der Literatur beschrieben (81).

4.6. Isolierung von mitochondrialen Ribosomen.

Isolierte Mitochondrien (vgl. 4.2) wurden in AMT-Puffer (100 mM NH₄Cl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,6; 1 - 2 mg Mitochondrienprotein pro ml AMT-Puffer) resuspendiert und durch Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 2 %) in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel bei Eis-temperatur lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (30 min, 30000 x g) gereinigt. Durch 2-stündige Ultra-

zentrifugation (144000 x g) wurden die Ribosomen sedimentiert. Dazu wurde das Lysat auf eine 48%ige Saccharose-Lösung in AMT (2 ml) geschichtet. Die Ribosomen sedimentierten durch das Saccharose-Kissen. Anschließend wurden die Ribosomen in wenig AMT-Puffer (100 - 200 μ l pro 10 mg Mitochondrien-Protein) resuspendiert, in einer Tischzentrifuge (bei 4°C Raumtemperatur) zur Entfernung grober Verunreinigungen kurz zentrifugiert und in einem konvexen Saccharosegradienten, wie von NOLL (82) beschrieben, aufgetrennt: Gradientenvolumen 11 ml, 10 ml Vorlage einer 10,25%igen Saccharose in AMT, Reservoir 48%ige Saccharose in AMT. Zentrifugation erfolgte im Beckman-Spinco-Rotor SW 41 bei 286000 x g, 2 Stunden, 0°C. Der Gradient wurde durch Auspumpen fraktioniert. Dabei wurde die Absorption bei 260 nm (A_{260}) im Durchfluß gemessen (Gerät: Zeiss PMQ 2). Eine optische Einheit ($O.D._{260}$) ist die Menge an Ribosomen, die bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Küvette von 1 cm Weglänge die Extinktion 1 ergibt (entspricht etwa 40 - 50 μ g Ribosomen).

4.7. Isolierung von cytoplasmatischen Ribosomen.

Zur Herstellung von cytoplasmatischen Ribosomen wurden die gewaschenen Zellen, wie unter 4.4.2. beschrieben, mit Quarzsand aufgeschlossen und eluiert. Anstelle des dort verwendeten EDTA-haltigen Isolationsmediums wurde Mg^{2+} -haltiges Isolationsmedium eingesetzt (0,1 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,44 M Saccharose, pH 7,5). Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation abgetrennt (20 min, 27000 x g). Der post-mitochondriale Überstand wurde mit Triton X - 100 (Endkonzentration 2 %) behandelt und nach einer Clarifying-Zentrifugation (30 min, 30000 x g) über ein 48%iges Saccharose-Kissen in AMT geschichtet (vgl. Isolierung von mitochondrialen Ribosomen). Nach 2stündiger Zentrifugation

(144000 x g) befinden sich die cytoplasmatischen Ribosomen im Pellet. Sie wurden in wenig AMT-Puffer resuspendiert, in einer Tischzentrifuge (bei 4°C Raumtemperatur) zur Entfernung grober Verunreinigungen kurz zentrifugiert und in einem konvexen Saccharosegradienten, wie oben beschrieben (4.6.), aufgetrennt und untersucht.

4.8. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation der Mitochondrienpräparationen.

Die Mitochondrienpräparationen (Herstellung siehe 4.2.1.) wurden in Isolationsmedium suspendiert (etwa 20 mg Mitochondrienprotein pro 5 ml) und auf einen linearen Saccharosedichtegradienten aufgetragen. Gradientenvolumen: 50 ml (0,95 - 1,5 M Saccharose) in Tris-HCl-Puffer, pH 7,5. Es wurde 60 min bei 75000 x g in einer Beckman-Spinco-Ultrazentrifuge (Rotor SW 25) zentrifugiert. 11 Fraktionen zu je 5 ml wurden geschnitten.

4.9. Herstellung der Inhibitor-Fraktion.

Zellen wurden auf einer Nutsche abgesaugt und mit kaltem Wasser (etwa 1/4 l pro l) gewaschen. Sie wurden anschließend in 3 Teile kaltem Wasser aufgenommen, und etwa 1 min in einem Braun-Mixer homogenisiert. Das Homogenat wurde schnell auf 65 - 70°C erhitzt und mit Perchlorsäure (Endkonzentration 5 %) 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur (Eisbad) wurde mit KOH (5n) neutralisiert. Der Sumpf wurde auf 4°C abgekühlt und zentrifugiert (10 min, 30000 x g). Der Überstand wurde gesammelt und mit Ammoniumsulfat (Endkonzentration 25 %) 10 - 14 Stunden bei 4°C stehengelassen. Die Fällung wurde abzentrifugiert (10 min, 30000 x g) und verworfen. Der

Überstand wurde nochmals mit Ammoniumsulfat (Endkonzentration 75 %) versehen und 24 Stunden bei Eistemperatur stehengelassen. Diese Fällung wurde durch Zentrifugation (15 min, 30000 x g) gesammelt und mit Wasser (1 : 2) bei 4°C 4 - 6 Stunden gerührt. Nach Zentrifugation (20 min, 30000 x g) wurde der Überstand sorgfältig mit einer Pipette abgehoben, mit dem gleichen Volumen Chloroform geschüttelt und nochmals zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde tiefgefroren und lyophilisiert, um alles Chloroform zu entfernen. Das in Wasser aufgenommene Lyophilisat (1 ml pro mg) wurde zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen und gegen ein großes Volumen Wasser dialysiert, um vorhandenes Ammoniumsulfat zu beseitigen (Ausschlußgrenze etwa Molekulargewicht 5000). Die entstandene Lösung wurde lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde als Inhibitor-Fraktion bezeichnet.

4.10. Radioaktive Markierung der Zellen in vivo.

4.10.1. Homogene Markierung aller Zellproteine.

Zu einer logarithmisch wachsenden Zellkultur wurde radioaktives Leucin (Radiochemical Centre, Amersham, England) zugegeben. Die Zellen wurden 2 Stunden bei 25°C und steriler Belüftung weiterinkubiert.

4.10.2. Spezifische Markierung in Gegenwart von CHI.

Nach durchschnittlich 16 Stunden Zuchtdauer wurden die Zellen mit CHI (0,1 mg/mg Kulturmedium) vergiftet. Dann wurde zu verschiedenen Zeitpunkten radioaktives Leucin zugegeben und unter steriler Belüftung weiterinkubiert. Besondere Bedingungen sind jeweils im Text angegeben.

4.11. Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien.

4.11.1. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (in Anlehnung an Sebald et al (83)).

Das Inkubationsmedium enthält:

30 mM KCl, 150 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM KH_2PO_4 , 4 mM ATP, 60 mM TRA-HCl, 30 mM TRA, ferner 0,25 mM aller L-Aminosäuren außer Leucin. Der pH wurde auf 7,85 mit KOH eingestellt.

4.11.2. Herstellung eines Inkubationsmediums mit cytoplasmatischem Überstand (Zellsaft).

Zellen wurden mit Quarzsand aufgeschlossen, wie unter 2.2. beschrieben. Anstelle des dort verwendeten Isolationsmediums wurde Inkubationsmedium verwendet. Anschließend wurden weitere 3 - 4 Teile Inkubationsmedium zugesetzt und der Ansatz im Mörtel homogenisiert. Das Homogenat wurde 5 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend ultrazentrifugiert (120 min, 144000 x g), um cytoplasmatische Ribosomen und sonstige partikuläre Zellbestandteile zu entfernen. Der resultierende Überstand wird als Zellsaft bezeichnet.

4.11.3. Inkubationsbedingungen.

Isolierte Mitochondrien (vgl. 2.) wurden im Inkubationsmedium (11.1) oder Zellsaft (11.2) resuspendiert (1 mg Mitochondrienprotein pro ml). Im ersten Fall wurde unmarkiertes Leucin (Endkonzentration 33 μM) und 3-H Leucin (200 μCi /1,2 ml) zugegeben. Im zweiten Fall wurde nur 3-H Leucin zugesetzt (200 μCi /1,2 ml). Die Leucinkonzentration im Zellsaft wurde durch die Zugabe definierter Leucinmengen zum Inku-

bationsansatz festgestellt. Diejenige Konzentration, die nötig war, den radioaktiven Einbau um 50 % zu verringern, entsprach der Leucinkonzentration im Zellsaft. In allen Versuchen war diese Konzentration etwa 10mal größer als K_m des Leucineinbaus ($K_m = 5 \times 10^{-6} M$). Es wurde bei 25°C inkubiert.

Bei Inkubation mit Neurospora-Inhibitor (IF) wurde in der Kontrolle jeweils eine entsprechende Proteinmenge zugegeben.

4.12. Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien in Gegenwart von cytoplasmatischen Ribosomen und Zellsaft.

Zellen wurden isoliert und mit Quarzsand und Inkubationsmedium aufgeschlossen (siehe 4.11.2.). Das Homogenat wurde hier jedoch 2 x 5 min bei 2000 x g zentrifugiert, um sicher zu sein, daß alle nicht aufgeschlossenen Hyphen abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde anschließend sofort mit 3-H Leucin (200 uCi/1,2 ml) bei 25°C inkubiert. Die Abwesenheit von nicht aufgeschlossenen Zellen im Inkubationsansatz wurde kontrolliert.

4.13. Immunopräzipitation mit Antiserum gegen Cytochromoxidase.

4.13.1. Herstellung des Antiserums.

Antiserum gegen Cytochromoxidase (Geschenk von H. Weiss (84, 85) wurde hergestellt, indem isolierte Cytochromoxidase und komplettes Freund'sches Adjuvans (Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.) Hasen subkutan verabreicht wurden (1 : 1 v/v). Den Hasen wurden 4 mal etwa 1 - 2 mg Cytochromoxidase in Abständen von 10 Tagen verabreicht. (S. Werner (44) stellte freundlicherweise einen Teil des verwendeten Antiserums zur Verfügung).

4.13.2. Fällung mit Antiserum.

Die Immunopräzipitation wurde in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 8) oder in Tris-KCl-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,3 M KCl, pH 7,5) in Gegenwart von 1,5 % Triton X-100 ausgeführt. Drei verschiedene Methoden wurden dabei angewendet:

- a) Die Proteinextraktionen aus ganzen Zellen in Natriumphosphat-Puffer (vgl. 4.1.) wurden nach einer Clarifying-Zentrifugation (15 min, 30000 x g) mit Antiserum 12 - 14 Stunden inkubiert.
- b) Isolierte Mitochondrien und mitochondriale Membranen wurden mit Triton-haltigem Puffer in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel lysiert. Nach einer Clarifying-Zentrifugation wurde, je nachdem ob mit Tris-KCl- oder mit Natriumphosphat-Puffer gearbeitet wurde, 4 - 5 bzw. 12 - 14 Stunden mit Antiserum inkubiert.
- c) In vitro-Inkubationsansätze mit isolierten Mitochondrien wurden im Verhältnis 1 : 3 mit Triton-haltigem Tris-KCl-Puffer behandelt, in dem etwa 1 mg unmarkiertes Mitochondrienprotein gelöst war. Mit Antiserum wurde nach einer Clarifying-Zentrifugation etwa 4 - 5 Stunden inkubiert.

Anschließend wurde jeweils mit einer Tischzentrifuge das Immunopräzipitat abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde dreimal mit dem jeweils verwendeten Triton-haltigen Puffer und zweimal mit Triton-freiem Puffer (0,1 M Natriumphosphat-puffer, pH 8, oder 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in 2%igem SDS-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8) über Nacht aufgelöst.

4.14. Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese.

4.14.1. Vorbereitung der Gele.

Für alle Elektrophoresen wurden 15%ige Gele verwendet, die aus folgenden Lösungen hergestellt wurden:

1. 12 g Acrylamid, 320 g Bisacrylamid, 100 μ l Tetramethyl-
äthylendiamin, ad 60 ml Wasser;
2. 100 mg Ammoniumperoxodisulfat ad 20 ml Wasser.

Beide Lösungen wurden bei Eistemperatur gemischt und dann in zerlegbare Kunststoff-Formen (2 x 75 x 150 mm) gegossen, in denen Auftragsspalten (Volumen 20 μ l) vorgeformt waren. Nach erfolgter Polymerisation (etwa 1 Stunde), wurden die Gele mindestens 1 Tag mit Elektrophorese-Puffer (0,5 % SDS, 0,1 Tris-HCl, pH 8) äquilibriert.

4.14.2. Vorbereitung der Proben.

Die zu untersuchenden Proben wurden in einer Konzentration von 50 - 150 μ g Protein/20 μ l in SDS-haltigem Puffer auf das Gel aufgetragen. (1 % SDS, 0,1 M Tris-HCl, pH 8). Gewöhnlich wurden die Proben (Mitochondrien, mitochondriale Membranen) nach der Lyse mit SDS-haltigem Puffer bei 4°C kurz mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile zu entfernen. Die Vorbereitungs- und Lösungsbedingungen anderer Proben sind im Text zu den Abbildungen angegeben. Alle lysierten Proben wurden fünfmal gegen Leucin-haltigen Elektrophorese-Puffer (1 mM Leucin) dialysiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Nachdem die gelösten Proteine in das Gel eingewandert waren ($E = 5$ Volt/cm), wurde die Feldstärke erhöht ($E = 15$ Volt/cm). Das Gel wurde beidseitig auf Zimmertemperatur gehalten.

4.14.3. Eichung der Gele.

Die Eichung der Gele nach Molekulargewichten erfolgte durch Rinderserumalbumin, Lactatdehydrogenase, Triosephosphatisomerase, Lactoglobulin, Cytochrom c und Glucagon. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte in 0,25 % Coomassie-Brilliant-Blue in Methanol/Wasser/Eisessig (5 : 5 : 1 v/v/v). Entfärbt wurde im gleichen Lösungsmittel ca. 40 Stunden.

4.15. Radioaktivitätsmessungen.

4.15.1. Meßgerät, Lösungen.

Die Messung von Radioaktivitäten erfolgte in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer vom Typ Tricarb der Fa. Packard Instruments. Als Szintillationsflüssigkeit diente eine Lösung von 6 g Szinti-Mix I (Packard Instruments) in 600 ml Toluol und 400 ml 2-Methoxyäthanol. Die Zählflasche in Kunststoff-Szintillationsgläschen (Fa. Hormuth, Heidelberg) betrug bei alleiniger Zählung von 3-H-Leucin 24 - 28 % , bei 14-C Leucin 43 - 46 %.

4.15.2. Vorbereitung der Proben.

Gewöhnlich wurde zur Messung der Radioaktivität die zu untersuchende Probe mit 0,5 ml SDS-haltigem Puffer (1 % SDS, 0,1 M Tris-HCl, pH 8) bei Raumtemperatur aufgelöst. Schwerlösliche Proben wurden im siedenden Wasserbad 30 - 60 min inkubiert. Dann wurden 12 ml Szintillationsflüssigkeit zugefügt und die Radioaktivität bestimmt.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den Gelen wurde diese in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Gelscheiben wurden in 0,5 ml SDS-haltigem Puffer 12 Stunden bei 60° C in Kunststoff-Szintillationsgläschen inkubiert. Nach Auffüllen

mit Szintillationsflüssigkeit (12 ml) wurde die Radioaktivität gemessen.

Zur Messung der in vitro in Protein eingebauten Radioaktivität wurden aliquote Mengen des Inkubationsansatzes (vgl. 11.3.) auf Whatmann-Glasfaserfilter (Durchmesser 2,5 cm) pipettiert, die mit 10 % TCA-Äther imprägniert waren. Die Glasfaserfilter wurden dann wie folgt behandelt:

2 mal mit 5 % TCA bei Zimmertemperatur, einmal 10 min 5 % TCA bei 90°C, 2 mal 3 min mit 5 % TCA bei Zimmertemperatur, 2 mal mit Äther/Äthanol (1 : 1), und einmal mit Äther. Die Filter wurden dann getrocknet und mit 0,5 ml SDS-haltigem Puffer in Szintillationsgläschen bei 60° C eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität gemessen.

4.16. Bestimmung der Aminosäurepools.

Zellen wurden nach verschiedenen CHI-Vorinkubationszeiten aus aliquoten Portionen geerntet und sofort mit Stickstoff tiefgefroren. Jeweils etwa 200 mg Zellen wurden mit 5 ml Perchlorsäurelösung (5%ige Perchlorsäure in Wasser/Äthanol (1 : 1) mit etwa 5000 Ipm 3-H Leucin pro ml als Kontrolle) bei -30°C mit einem Ultra-turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 0°C zentrifugiert (20 min, 30000 x g) und der Überstand wurde sorgfältig gesammelt. Anschließend wurde mit 5 n KOH sofort neutralisiert und nochmals zentrifugiert (20 min, 30000 x g). Der resultierende Überstand wurde über KOH auf 0,5 ml eingengt und nochmals mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert (5 min, 3500 x g). Die ölige Probe wurde mit Chloroform (Zweiphasen-Trennung) behandelt. Die wässrige Phase wurde sorgfältig gesammelt und die Radioaktivität in der Probe zur Bestimmung des Verlustes an Leucin

gemessen. Der Gehalt an den einzelnen Aminosäuren wurde anschließend durch Ionenaustausch-Chromatographie bestimmt.

4.17. Proteinbestimmungen.

Protein wurde nach der Biuretmethode von BEISENHERZ et al (86) und nach der Methode von LOWRY et al (87) bestimmt.

4.18. Succinatdehydrogenase (SDH)-Untersuchungen.

Tests wurden ausgeführt nach der Methode von WERNER et al (88).

4.19. Materialien.

Radioaktiv markiertes Leucin : Radiochemical Centre, Amersham, England.
(3-H Leucin : durchschnittlich etwa 50 Ci/mMol, 14-C Leucin : etwa 270 mCi/mMol);
Cycloheximid : Carl Roth, Karlsruhe;
Puromycin: Sigma Chemical Co., St.Louis, U.S.A.;
ATP, GTP, LDH, BSA, TIM, Cytochrom c, RNase : Boehringer, Mannheim;
SDS, Coomassie-Blue, Acrylamid, Bisacrylamid, Tetramethyl-äthylendiamin, Triäthanolamin, Triton X-100, DFP : Serva GmbH, Heidelberg;
Freund'sches Adjuvans: Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.;
Quarzsand, TCA : Riedel-DeHaen AG, Seelze Hannover;
Saccharose, Tris-HCl, EDTA, PMSF, Salze und sonstige Lösungsmittel (p.A.) : Merck AG, Darmstadt;
Scinti-Mix I: Packard Instruments, Frankfurt;
Chloramphenicol : Bayer AG, Leverkusen;
2-Metoxyäthanol: Farbwerke Höchst AG, Gendorf;
Toluol: ARAL AG, Ingolstadt.

5. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AMT	Ammoniumchlorid-Magnesiumchlorid-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Rinderserumalbumin
CAP	Chloramphenicol
CHI	Cycloheximid
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GTP	Guanosintriphosphat
LDH	Lactatdehydrogenase
MG	Molekulargewicht
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuclease
RNA	Ribonucleinsäure
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TIM	Triosephosphatisomerase
TRA	Triäthanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Abhängigkeit der mitochondrialen Proteinsynthese von der cytoplasmatischen Proteinsynthese wurde in zwei experimentellen Systemen untersucht: in vivo, das heißt in ganzen Zellen, in vitro, das heißt unter Einsatz von isolierten Mitochondrien.

I. In vivo wurde die cytoplasmatische Proteinsynthese durch Cycloheximid spezifisch ausgeschaltet. Folgende Beobachtungen wurden anschließend über eine halbe Verdopplungsperiode von Neurospora-Zellen gemacht:

1. Die Proteinsyntheseleistung der mitochondrialen Ribosomen bleibt konstant. Diese Feststellung bedarf der Kenntnis sekundärer und unspezifischer Effekte von Cycloheximid. Unter Einwirkung des Antibiotikums nehmen die intrazellulären Aminosäure-Konzentrationen stark zu (Leucin nimmt um den Faktor 8 zu). Ferner werden Aminosäuren verstärkt metabolisiert. Puls-Chase-Techniken erwiesen sich am geeignetsten, um die mitochondriale Syntheserate zu untersuchen.
2. Innerhalb 30 min nach Hemmung der cytoplasmatischen Proteinsynthese nimmt der Anteil der in die mitochondriale Innenmembran integrierten mitochondrialen Translationsprodukte auf etwa 40 % ab. Dieser Anteil bleibt im weiteren Verlauf konstant. Die nicht integrierten Produkte werden proteolytisch abgebaut.
3. Nach langer Hemmung der cytoplasmatischen Proteinsynthese werden die gleichen Produkte in die mitochondriale Innenmembran integriert wie nach kurzen Hemmzeiten. Das quantitative Verhältnis der integrierten Produkte ändert sich geringfügig. Der Anteil der Produkte mit niedrigen Molekulargewichten (kleiner als 15000) nimmt zu. Die integrierten Produkte sind stabil.

4. Die drei mitochondrial gebildeten Untereinheiten der Cytochromoxidase werden nach Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese sogar für ca. eine Verdopplungsperiode noch synthetisiert und in die Innenmembran integriert. Sie bilden unter bestimmten Voraussetzungen einen Komplex, der mit Antikörper gegen intakte Cytochromoxidase präzipitiert werden kann.

II. In vitro wurden mit isolierten Mitochondrien folgende Befunde erhoben:

1. Die Translationsprodukte in vitro gleichen weitgehend den Produkten, die in Gegenwart von Cycloheximid in intakten Zellen gebildet werden. Dies ist allerdings nur zu beobachten, wenn während der Inkubation ein aus ganzen Zellen isolierter Proteinase-Inhibitor eingesetzt wird. In Abwesenheit dieses Inhibitors werden in vitro synthetisierte Translationsprodukte spezifisch abgebaut. Ferner muß in vitro die Wirkung vesikulärer Proteinasen beachtet werden, die zusammen mit den Mitochondrien isoliert werden und unspezifisch alle Mitochondrienproteine angreifen.
2. Die in vitro gebildeten Polypeptide werden zum überwiegenden Teil fest in die mitochondriale Membran integriert. Ein Teil der proteolytischen Abbauprodukte in vitro gebildeter Polypeptide verläßt das Mitochondrium.
3. Sämtliche mitochondrial synthetisierten Untereinheiten der Cytochromoxidase werden in vitro hergestellt. Die Assemblierung dieser Untereinheiten zu einem Komplex, der mit Antikörper gegen intakte Cytochromoxidase präzipitiert werden kann, ist von der Anwesenheit

cytoplasmatisch synthetisierter Polypeptide im Inkubationsmedium abhängig. Ein Teil dieser Polypeptide besitzt die gleiche gelelektrophoretische Beweglichkeit wie zwei cytoplasmatische Untereinheiten (6 und 7) der Cytochromoxidase.

4. Mitochondrien, die aus Zellen isoliert wurden, in denen die cytoplasmatische Proteinsynthese für eine halbe Verdopplungsperiode durch Cycloheximid gehemmt war, synthetisieren die gleichen Polypeptide in nahezu dem gleichen Ausmaß wie Mitochondrien aus unbehandelten Zellen.
5. In einem Zellhomogenat, in dem neben Mitochondrien auch cytoplasmatische Ribosomen vorhanden waren, konnten neben den drei mitochondrialen Untereinheiten der Cytochromoxidase auch alle vier cytoplasmatischen Untereinheiten in vitro synthetisiert werden. Die Untereinheiten wurden in diesem System zu einem Komplex assembliert, der mit Antikörper gegen die gesamte Cytochromoxidase präzipitiert wird.

Im Hinblick auf die Koordination von mitochondrialer und cytoplasmatischer Proteinsynthese werden folgende Hypothesen aufgestellt und diskutiert:

1. Die Translation an mitochondrialen Ribosomen ist nur relativ locker an die cytoplasmatische Proteinsynthese gekoppelt.
2. Die Integration mitochondrialer Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran ist nur zu einem gewissen Grad von der Synthese cytoplasmatischer Translationsprodukte abhängig.
3. Mitochondrien besitzen spezifische Proteinasen, die beim Ausfallen der cytoplasmatischen Proteinsynthese einen Teil der mitochondrialen Translationsprodukte vor ihrer Inte-

gration in die mitochondriale Membran abbauen können. Damit kann der Spiegel mitochondrialer Translationsprodukte in der Mitochondrienmembran indirekt geregelt werden. Die Aktivität der Proteinasen wird durch cytoplasmatisch synthetisierte Inhibitoren beeinflusst.

4. Die Assemblierung von mitochondrial synthetisierten Untereinheiten der Cytochromoxidase zu größeren Enzymvorstufen ist an die Anwesenheit cytoplasmatisch gebildeter 'Partner'-proteinen gekoppelt. Diese Proteine stellen wahrscheinlich cytoplasmatische Untereinheiten der Cytochromoxidase dar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ashwell, M. , Work, T.S., Ann.Rev.Biochem. 39, 251 (1970)
2. Beattie, D.S., Sub.Cell.Biochem. 1, 1 (1971)
3. Borst, P., Ann.Rev.Biochem. 41, 333 (1972)
4. Schatz, G., Mason, L., Ann.Rev.Biochem. 43, 51 (1974)
5. Lloyd, D., The Mitochondria of Microorganisms, Academic Press Inc., London 1974
6. Schatz, G. in: Membranes of Mitochondria and Chloroplasts, ed. Racker, E., Van Nostrand Reinhold Corp., New York 1969
7. Westergaard, O., Marcker, K.A., Keiding, J., Nature 227, 708 (1970)
8. Küntzel, H., Schäfer, H.P., Nature New Biol. 231, 265 (1971)
9. Richter, D., Biochemistry 10, 4422 (1971)
10. Neupert, W., Sebald, W., Schwab, A.J., Pfaller, A., Massinger, P., Bücher, Th., Eur. J. Biochem. 10, 585 (1969)
11. Lizardi, P.M., Luck, D.J.L., J.Cell Biol. 54, 56 (1972)
12. Beattie, D.S., Arch.Biochem.Biophys. 147, 136 (1971)
13. Watson, K., Haslam, J.M., Veitch, B., Linnane, A.W. in: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts, eds. Boardmann, N.K., Linnane, A.W., Smillie, R.M., North-Holland Inc., Amsterdam 1971
14. Gordon, P.A., Lowdon, M.J., Stewart, P.R., J.Bacteriol. 110, 511 (1972)
15. Kováč, L., Šubík, J., Russ, G., Kollár, K., Biochim.Biophys. Acta 144, 94 (1967)
16. González-Cadavid, N.F., Sub.Cell.Biochem. 3, 275 (1974)
17. Rouslin, W., Schatz, G., Biochem.Biophys.Res.Commun. 37, 1002 (1969)
18. Mason, T.L., Schatz, G., J.Biol.Chem. 248, 1355 (1973)
19. Butow, R.A., Ferguson, M.J., Cederbaum, A., Biochemistry 12, 158 (1973)

20. Ebner, E., Mason, T., Federation Proc. 31, 1402 (1972)
21. Barath, Z., Küntzel, H., Nature New Biol. 240, 195 (1972)
22. Küntzel, H., Barath, Z., Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69, 1371 (1972)
23. Edwards, D.L., Rosenberg, E., Maroney, P.A., J.Biol.Chem. 249, 3551 (1974)
24. Pestka, S., Ann.Rev.Microbiol. 25, 487 (1971)
25. Kerridge, D., J.Gen.Microbiol. 19, 497 (1958)
26. Siegel, M.R., Sisler, H.D., Biochim,Biophys.Acta 103, 558 (1965)
27. Sebald, W., Hofstötter, T., Hacker, D., Bücher, Th., FEBS Lett. 2, 177 (1969)
28. Sebald, W., Birkmayer, G.D., Schwab, A.J., Weiss, H., in: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts, eds. Boardman, N.K., Linnane, A.W., Smillie, R.M., North-Holland Inc., Amsterdam 1971
29. Küntzel, H., Nature 222, 142 (1969)
30. Neupert, W., Sebald, W., Schwab, A.J., Massinger, P., Bücher, Th. Eur.J.Biochem. 10, 589 (1969)
31. Michel, R., Schweyen, R.J., Kaudewitz, F., Mol.Gen.Genet. 111, 235 (1971)
32. Schatz, G., Saltzgaber, J., Rouslin, W., in: Electron Transport and Energy Conversion, eds. Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E., Slater, E., Adriatica Editrice, Bari 1970
33. Hawley, E.S., Greenawalt, J.W., J.Biol.Chem. 245, 3574 (1970)
34. Schwab, A.J., Dissertation, Universität München 1972
35. Sebald, W., Machleidt, W., Otto, J., Eur.J.Biochem. 38, 311 (1973)
36. Wagner, R.P., Bergquist, A., Barbee, T., Biochim.Biophys. Acta 100, 444 (1965)
37. Bender, D.A., Amino Acid Metabolism, John Wiley & Sons, London 1975
38. Michel, R., Neupert, W., Eur.J.Biochem. 36, 53 (1973)

39. Rendi, R., Exp.Cell Res. 18, 187 (1959)
40. Mager, J., Biochim.Biophys.Acta 38, 150 (1960)
41. Sebald, W., Weiss, H., Jackl, G., Eur.J.Biochem. 22, 19 (1972)
42. Rubin, M.S., Tzagoloff, A., J.Biol.Chem. 248, 4275 (1973)
43. Schwab, A.J., Sebald, W., Weiss, H., Eur.J.Biochem. 30, 511 (1972)
44. Werner, S., Eur.J.Biochem. 43, 39 (1974)
45. Matile, Ph., in: Lysosomes in Biology and Pathology, eds. Dingler, J.T. & Fell, H.B., North-Holland Inc., Amsterdam 1969, Vol. 1
46. Tappel, A.L., in: Lysosomes in Biology and Pathology, eds. Dingler, J.T. & Fell, H.B., North-Holland Inc., Amsterdam 1969, Vol. 2
47. Michel, R., Liebl, A., Hartmann, A., Neupert, W., Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, 415 (1976)
48. Hazen, G.G., in: Methoden der enzymatischen Analyse, ed. Bergmeyer, H.U., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1974)
49. Matile, Ph., Naturwissenschaften 51, 489 (1964)
50. Matile, Ph., Z.Zellforschung 65, 884 (1965)
51. Yu, P.H., Kula, M.R., Tsai, H., Eur.J.Biochem. 32, 129 (1973)
52. Betz, H., Hinze, H., Holzer, H., J.Biol.Chem. 249, 4515 (1974)
53. Borst, P., Grivell, L.A., FEBS Lett. 13, 73 (1971)
54. Küntzel, H., Curr.Top.Microbiol.Immunol. 54, 94 (1971)
55. Ruecker, A.v., Werner, S., Neupert, W., FEBS Lett. 47, 290 (1974)
56. Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, eds. Fritz, H., Tschesche, H., Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York 1970
57. Tschesche, H., Angew.Chem. 86, 21 (1974)

58. BAYER Symposium V "Proteinase Inhibitors", eds. Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1974
59. Vogel, R., Trautschold, I., Werle, E., *Natürliche Proteinase Inhibitoren*, Thieme Verlag, Stuttgart 1968
60. Ebner, E., Mennucci, L., Schatz, G., J.Biol.Chem. **248**, 5360 (1973)
61. Kuželá, Š., Grečná, E., Experientia **25**, 776 (1969)
62. Mahler, H.R., Feldman, F., Phan, S.H., Hamill, P., Dawidowicz, K., in : *Biogenesis of Mitochondria*, eds. Kroon, A.M., Saccone, C., Academic Press, London, New York 1974
63. Tzagoloff, A., Akai, A., J.Biol.Chem. **247**, 6517 (1972)
64. Rendi, R., Exp.Cell Res. **18**, 193 (1959)
65. Mager, J., Biochim.Biophys.Acta **38**, 150 (1960)
66. Clark-Walker, G.H., Linnane, A.W., Biochem.Biophys.Res. Commun. **25**, 8 (1966)
67. Lambowitz, A.M., Slayman, C.W., Slayman, C.L., Bonner, W.D., J.Biol.Chem. **247**, 1536 (1972)
68. Schwab, A.J., FEBS Lett. **35**, 63 (1973)
69. Werner, S., Schwab, A.J., Neupert, W., Eur.J.Biochem. **49**, 607 (1974)
70. Schwab, A.J. in : *Biogenesis of Mitochondria*, eds. Kroon, A.M., Saccone, C., Academic Press, London, New York 1974
71. Ibrahim, N.G., Beattie, D.S., J.Biol.Chem. **251**, 108 (1976)
72. Ebner, E., Mason, T.L., Schatz, G., J.Biol.Chem. **248**, 5369 (1973)
73. Ono, B., Fink, G., Schatz, G., J.Biol.Chem. **250**, 775 (1975)
74. Goldberg, A.L., Wittes, R.B., Science **153**, 420 (1966)
75. Woese, C.R., Biol.Sci. **20**, 471 (1970)
76. Goldberg, A.L., Howell, E.M., Li, J.B., Martel, S.B., Prouty, W.F., Federation Proc. **33**, 1112 (1974)

77. Dice, J.F., Goldberg, A.L., Ann.Rev.Biochem. 43, 835 (1974)
78. Michel, R., Liebl, A., Machleidt, W., Otto, J., Neupert, W., Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 1595 (1975)
79. Vogel, H.J., Microbiol.Genet.Bull. 13, 42 (1956)
80. Weiss, H., v.Jagow, G., Klingenberg, M., Bücher, Th., Eur.J.Biochem. 14, 75 (1970)
81. Merck, Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, 1970
82. Noll, H., Nature 215, 360 (1967)
83. Sebald, W., Bücher, Th., Olbrich, B., Kaudewitz, F., FEBS Lett. 1, 235 (1968)
84. Weiss, H., Bücher, Th., Eur.J.Biochem. 17, 561 (1970)
85. Weiss, H., Sebald, W., Bücher, Th., Eur.J.Biochem. 22, 19 (1971)
86. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G., Z.Naturforschung 8 b, 555 (1953)
87. Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.L., J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)
88. Werner, S., Neupert, W., Eur.J.Biochem. 25, 379 (1970)

Lebenslauf

Am 6. Juli 1943 wurde ich als viertes und letztes Kind des Nicolaus von Rücker - Diplom Ingenieur - und seiner Ehefrau Ilse, geborene Carstens, in München geboren. 1948 wanderten meine Eltern nach Kanada aus. In Montreal besuchte ich von 1949-1951 die Elementary School, die der deutschen Volksschule entspricht. 1951 siedelten wir nach U.S.A. um. In South Bend, Indiana bestand ich 1953 die Aufnahmeprüfung in die High-School, die ich bis 1956 besuchte. 1956 zogen meine Eltern zurück nach Deutschland. In Stuttgart besuchte ich von 1956-1962 verschiedene private und staatliche Schulen. 1962 kamen wir zurück nach München. Hier bestand ich an der Rupprecht-Oberrealschule 1964 das Abitur. Ich studierte zuerst bis 1967 Rechtswissenschaften in Berlin und München (Abschluß als cand. iur.). Im Wintersemester 1967/68 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Technischen Hochschule in München. Acht Semester später legte ich die Diplom-Chemikerhauptprüfung ab. Meine biochemische Diplomarbeit fertigte ich unter der Anleitung von PD Dr. H. Tschesche am Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule München an. Seit November 1972 arbeite ich am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München. An diesem Institut entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. Th. Bücher und PD Dr. W. Neupert diese Doktorarbeit.

